

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

**Aktivität der N-Azetyl- β -Glucosaminidase
im Serum des Menschen. Testverbesserung
und Serumaktivität bei Herzinfarkt und
verschiedenen Schockformen.**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fachbereiche

5 Vorklinische und Theoretische Medizin und

6 Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Detlev Gudemann

aus Halle/Westf.

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555408_0060

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Aktivität der N-Acetyl- β -Glucosaminidase im Serum
des Menschen. Testverbesserung und Serumaktivität
bei Herzinfarkt und verschiedenen Schockformen.

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fachbereiche

5 Vorklinische und Theoretische Medizin und

6 Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Detlev Gudemann

aus Halle/Westf.

1981



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan : Prof. Dr. H.J.Küchle

1. Berichterstatter : Prof. Dr. G.Pott

2. Berichterstatter : Prof. Dr. U.Gerlach

Ich habe mich sehr bemüht, diesen Band zu schreiben,
und hoffe, dass er Ihnen einige Anregungen geben wird.

Mit freundlichen Grüßen,
Ihre Erbin

Dr. phil. h. c. h. E. v. ...

Ich habe mich sehr bemüht, diesen Band zu schreiben,
und hoffe, dass er Ihnen einige Anregungen geben wird.

Ich habe mich sehr bemüht, diesen Band zu schreiben,
und hoffe, dass er Ihnen einige Anregungen geben wird.

Ich habe mich sehr bemüht, diesen Band zu schreiben,
und hoffe, dass er Ihnen einige Anregungen geben wird.

Ich habe mich sehr bemüht, diesen Band zu schreiben,
und hoffe, dass er Ihnen einige Anregungen geben wird.

Ich habe mich sehr bemüht, diesen Band zu schreiben,
und hoffe, dass er Ihnen einige Anregungen geben wird.

Ich habe mich sehr bemüht, diesen Band zu schreiben,
und hoffe, dass er Ihnen einige Anregungen geben wird.

Ich habe mich sehr bemüht, diesen Band zu schreiben,
und hoffe, dass er Ihnen einige Anregungen geben wird.

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Referent: Prof.Dr.G.Pott Korreferent: Prof.Dr.U.Gerlach

Z u s a m m e n f a s s u n g

Gudemann, Detlev

AKTIVITÄT DER N-ACETYL- β -GLUCOSAMINIDASE IM SERUM DES MENSCHEN.
TESTVERBESSERUNG UND SERUMAKTIVITÄT BEI HERZINFARKT UND VERSCHIEDENEN SCHOCKFORMEN.

Um das Verhalten eines lysosomalen Enzyms bei Herzinfarkt und verschiedenen Schockformen zu untersuchen, wurde die N-Acetyl- β -Glucosaminidase E.C. 3.2.1.30, ein Enzym, das beim Abbau von Mucopolysaccharid-Proteinkomplexen beteiligt ist, ausgewählt. Die Vorstellung eines verbesserten Testsystems wurde durch Bestimmung des Enzyms in 85 Seren gesunder Personen, des pH-Optimums mit pH = 4,2 und der Michaelis-Konstanten K_m = 0,98 mM ermöglicht.

Die zugleich durchgeführte Untersuchung eines gereinigten Isoenzym A der N-Acetyl- β -Glucosaminidase aus Lebergewebe ergab ein pH-Optimum von pH = 4,2 und eine Michaelis-Konstante K_m von 0,95 mM.

Das pH-Optimum des Serums einer histologisch gesicherten Lebercirrhose zeigte ein pH von 4,2 und eine Michaelis-Konstante K_m von 0,90 mM.

Bei der Einteilung der Normalseren in drei Altersgruppen ergab sich ein signifikanter Anstieg des Enzyms mit zunehmendem Alter. Ein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Seren konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung von 30 Herzinfarkt- und 20 Schockpatienten wurde jeweils ein signifikanter Anstieg der Serumaktivität des Enzyms gefunden.

Die Befunde wurden im Vergleich zu Ergebnissen bei Lebererkrankungen diskutiert.

Tag der Promotion : 02.10.1981

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seitenzahl
1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. Problemstellung	1
1.2. Einführung	1
1.2.1. Herzinfarkt	1
1.2.2. Schock	2
1.3. Enzymale Wirkungsweise der N-Acetyl- β -Glucosaminidase	3
1.4. Lokalisation und Vorkommen der N-Acetyl- β -Glucosaminidase	4
1.5. Isoenzyme der N-Acetyl- β -Glucosaminidase	5
1.6. GM ₂ -Gangliosidosen	7
1.6.1. GM ₂ -Gangliosidose Typ I	7
1.6.2. GM ₂ -Gangliosidose Typ II	8
1.6.3. GM ₂ -Gangliosidose Typ III	8
1.7. N-Acetyl- β -Glucosaminidase und verschiedene Erkrankungen	9
1.8. Meßmethoden zur Bestimmung der N-Acetyl- β -Glucosaminidase im Serum	10
2. Materialien und Methoden	12
2.1. Gewinnung und Aufbewahrung der Serumproben	12
2.2. Auswahl der untersuchten Seren	12
2.2.1. Normalkollektiv	12
2.2.2. Herzinfarktpatienten	14
2.2.3. Schockpatienten	14
2.3. Enzymaktivitätsbestimmung	15
2.3.1. Allgemeines	15
2.3.2. Standardansatz	15

	Seitenzahl
2.3.3. Darstellung des gereinigten Isoenzym A	16
2.3.4. Bestimmung des pH-Optimums	17
2.3.5. Bestimmung der Michaelis-Konstanten	17
2.4. Statistik	17
3. Ergebnisse	19
3.1. Normalkollektiv	19
3.2. Herzinfarktpatienten	22
3.3. Schockpatienten	24
3.4. Michaelis-Konstanten	25
3.5. PH-Optimum	26
3.6. Korrelationsanalysen	28
4. Diskussion der Ergebnisse	32
4.1. Altersverteilung	32
4.2. Geschlechtsverteilung	35
4.3. Kinetische Parameter	37
4.3.1. Allgemeines	37
4.3.2. Einfluß allgemeiner Parameter	37
4.3.2.1. Auswahl des Normalkollektivs	37
4.3.2.2. Blutentnahme	38
4.3.2.3. Aufbewahrung und Verwendung des Serums	38
4.3.3. Diskussion der Meßmethode	39
4.3.3.1. Einfluß des Puffersystems	39
4.3.3.2. Einfluß von pH-Veränderungen	40

	Seitenzahl
4.3.3.3. Einfluß der Inkubationszeit	40
4.3.3.4. Einfluß des gewählten Substrates	41
4.3.3.5. Einfluß der Substratkonzentration	41
4.3.3.6. Einfluß von Inhibitoren und Aktivatoren	42
4.3.4. Auswahl der Meßmethode	42
4.3.5. Bestimmung des pH-Optimums	43
4.3.6. Bestimmung der Michaelis-Konstanten K_m	45
4.3.7. Isoelektrische Punkte	48
4.4. Schockpatienten	48
4.5. Herzinfarktpatienten	50
4.6. β -Glucosaminidase-Aktivität und Lebererkrankungen	52
4.7. β -Glucosaminidase und verschiedene Erkrankungen	54
4.7.1. Gelenkerkrankungen	54
4.7.2. Polymyositis, Dermatomyositis	55
4.7.3. Muskeldystrophie, primäre Myopathie systemischer Lupus erythematoses	55
4.7.4. Diabetes mellitus	55
4.7.5. Nierenerkrankungen	56
4.8. Schwangerschaft	57
4.9. Zusammenfassung und abschließende Bemerkung	57
5. Literaturverzeichnis	59
6. Danksagung	72
7. Lebenslauf	73

1. EINLEITUNG UND PROBLEM - STELLUNG

1. 1. PROBLEMSTELLUNG

Im folgenden soll die Serumaktivitätsverteilung des Enzyms N-Acetyl- β -Glucosaminidase bei je einem Kollektiv von 30 Patienten mit Herzinfarkt und 20 Patienten mit verschiedenen Schockformen dargestellt werden.

Anhand einer Gruppe von 85 Seren mit normalem Enzymmuster wird eine Verbesserung des Testsystems p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -Glucosaminid in Citratpuffer vorgestellt.

Mit Hilfe dieses Systems wird das pH-Optimum und die Michaelis-Konstante des Enzyms jeweils an Seren von Normalpersonen, des Serums einer histologisch gesicherten Lebercirrhose und an einem aus Lebergewebe isolierten und hochgereinigten Isoenzym A bestimmt.

Die erhaltenen Ergebnisse werden im Vergleich zu Befunden bei Leberkrankheiten diskutiert.

1. 2. EINFÜHRUNG

1. 2. 1. HERZINFARKT

Als Herzinfarkt bezeichnet man den irreversiblen Untergang eines umschriebenen Bezirks von Herzmuskelgewebe als Folge ei-

ner Unterschreitung der zum Überleben notwendigen minimalen Substratversorgung.

1. 2. 2. S C H O C K

Als Schock bezeichnet man eine akute Kreislaufinsuffizienz, bei der gleichzeitig in mehreren Organen die Kapillardurchblutung akut unter den Durchblutungsbedarf der Gewebe absinkt.

Bei beiden Krankheitsereignissen ergeben sich aus dem pathophysiologischen Zustand Konsequenzen für den Zellstoffwechsel, die sich zum Beispiel biochemisch im Anstieg einiger zellgebundener Enzyme im Serum nachweisen lassen.

Diese Enzyme sind fast ausschließlich zytoplasmatischen und mitochondrialen Ursprungs und werden mit biochemischen Testverfahren zur klinischen Diagnostik herangezogen.

Lysosomale Enzyme werden dagegen wegen mangelnder Organspezifität im Standardprogramm eines Krankenhauslabors nicht bestimmt.

Lysosomale Enzyme werden jedoch im Gegensatz zu zytoplasmatischen und mitochondrialen Enzymen nicht nur bei Zellschädigung oder Zelltod freigesetzt, sondern nach dem Hickman-Neufeld-Konzept auch von funktionsfähigen Zellen sezerniert (HICKMAN-NEUFELD 1972). Daher ist es von besonderer Bedeutung, mehr über die Serumaktivität lysosomaler Enzyme im Normalserum und bei pathophysiologischen Zuständen nekrotischer (Herzinfarkt) und hypoxischer (Schock) Zellen zu erfahren.

Das lysosomale Enzym N-Acetyl- β -Glucosaminidase (Synonyma:

β -Hexosaminidase, β -Glucosaminidase, Kurzform: β -NAG) E.C.

3.2.1.30 wurde zur Aktivitätsbestimmung ausgewählt, da es mit dem hier vorgestellten Testsystem leicht bestimmbar ist und ausreichend hohe Extinktionen im Serum gemessen werden können.

1. 3. E N Z Y M A L E W I R K U N G S W E I S E D E R N - A C E T Y L - β - G L U C O S A M I N I D A S E

Beim Angriff der Hyaluronidase auf Glykosaminoglykane (Mucopolysaccharid-Protein-Komplexe) entstehen geradzahlige Oligosaccharide, die durch alternierende Wirkung der β -Glucuronidase und der β -Glucosaminidase vom nicht reduzierenden Ende her schrittweise unter Abspaltung der Monosaccharide abgebaut werden.

Die Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die enzymatische Wirkungsweise der Hyaluronidase, der β -Glucuronidase und der β -Glucosaminidase und über die hierbei entstehenden Abbauprodukte. Als repräsentatives Mucopolysaccharid ist die Hyaluronsäure gewählt. Andere Mucopolysaccharide wie Chondroitin-4-sulfat und Chondroitin-6-sulfat, die in der Arterienwand gefunden werden, haben einen ähnlichen Abbauweg, allerdings mit geringerer Abbaurate, da Sulfatgruppen die Aktivität der Hyaluronidase verlangsamen. Die Anwesenheit von N-Acetyl- β -Galactosamin anstatt von N-Acetyl- β -Glucosamin macht die Verbindung weniger angreifbar für den Einfluß der β -Glucosaminidase. Dermatin-sulfat und Heparitin-sulfat scheinen nur zu einem geringen Prozentsatz abgebaut zu werden (BELFIORI 1974).

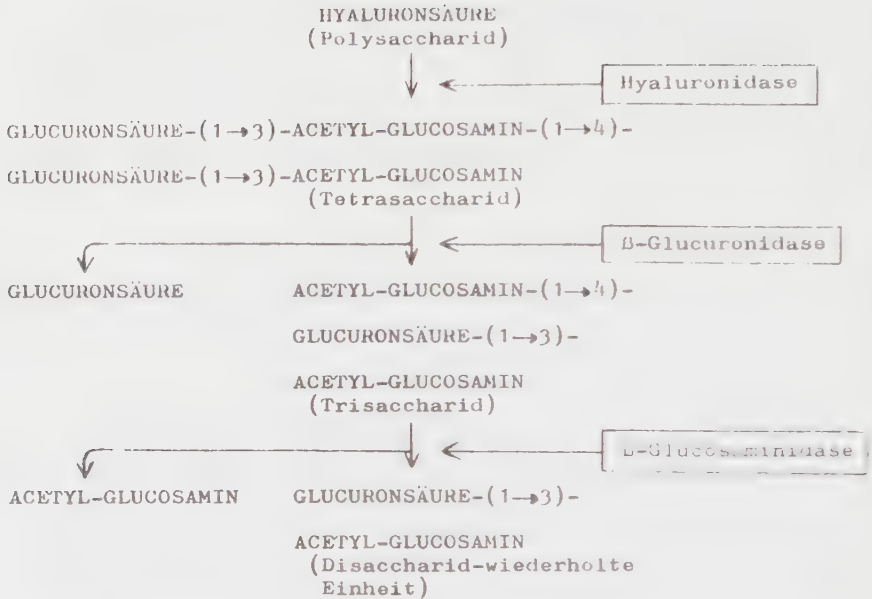


Abb. 1 Übersicht über die Rolle der β-Glucosaminidase und anderer lysosomaler Enzyme im katabolen Stoffwechsel eines repräsentativen Mucopolysaccharids, der Hyaluronsäure. In der Abbildung ist Acetyl-Glucosamin als Abkürzung für N-Acetyl-β-Glucosamin gebraucht.

1. 4. L O K A L I S A T I O N U N D V O R K O M M E N D E R N - A C E T Y L - β - G L U C O S A M I - N I D A S E

Die Lokalisation verschiedener Glykosidasen in den Lysosomen wurde u.a. von ROBINSON und STIRLING (1968) nachgewiesen. Bei ihren Untersuchungen der menschlichen Milz fanden sie den größten Teil der Enzymaktivität in der lysosomalen Fraktion.

Einige Autoren beschäftigten sich mit der Trennung und Reinigung der β -Glucosaminidase aus Schweineepididymis, Widderhoden, Rindermilz (FINDLAY 1960; CAYGILL 1966; MERSMANN 1974) oder aus Mikroorganismen wie *Phaseolus vulgaris*, *Aspergillus niger*, *Turbo cornutus* und *Staphylococcus aureus*, um nur einige zu nennen (BAHL 1968; MURAMATSU 1968; WADSTRÖM 1970).

Untersuchungen am Menschen ergaben das Vorkommen von β -Glucosaminidase in fast allen Organen und Geweben (PLATT 1970), im Serum (WOOLLEN 1975), im Urin (DANCE/PRICE 1968) und in der Synovialflüssigkeit (KAR 1973).

1. 5. I S O E N Z Y M E D E R N - A C E T Y L - β - G L U C O S A M I N I D A S E

Im Jahre 1968 beschrieben ROBINSON und STIRLING zum ersten Mal, daß menschliches Gewebe zwei Enzyme mit β -Glucosaminidase-Aktivität enthalte.

Laut DANCE et al. (1969) besitzen diese Enzyme auch β -Galaktosaminidase-Aktivität.

Beim Erhitzen auf 50° C bei pH 4,4 wird die saure Form Isoenzym A inaktiv, während die basische Form Isoenzym B stabil bleibt (OKADA/O'BRIEN 1969).

Wie von verschiedenen anderen Autoren (GOLDSTONE et al. 1971; SRIVASTAVA/BEUTLER 1972; CARROL/ROBINSON 1973) nachgewiesen wurde, haben Isoenzym A und B ähnliche Eigenschaften mit Ausnahme der Hitzestabilität und der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit.

Im menschlichen Serum findet sich eine Hauptaktivitätsform, die hitzelabil ist und ähnliche elektrophoretische Bewegung zeigt wie die aus anderen Geweben extrahierte Isoenzymform A (HULTBERG 1969; OKADA/O'BRIEN 1969; PRICE et al. 1970).

Es wurden jedoch auch geringe Mengen des hitzestabilen Isoenzyms B (STIRLING 1972), sowie bei Untersuchungen an Schwangeren ein Gesamtaktivitätsanstieg der β -Glucosaminidase und das Auftreten einer neuen - als Isoenzym P - bezeichneten Enzymbande beobachtet (HAYASE 1973).

Vier genetisch unterschiedliche Isoenzyme A, B, C und S, die aus menschlichem Gewebe und Körperflüssigkeiten isoliert wurden, und auf der Basis von Unterschieden im Molekulargewicht, der Hitzestabilität, des pH-Optimums und von immunologischen Kreuzreaktionen identifiziert wurden, sind zur Zeit bekannt (PRICE/DANCE 1972; STIRLING 1972; HOOGHWINKEL 1972; SRIVASTAVA 1975; IKONNE 1975; SWALLOW 1976; NAKAGAWA 1977).

Weiterhin wurden durch die u.a. Trennverfahren drei zusätzliche Enzymbanden I_1 , I_2 und P beobachtet (STIRLING 1971, 1972; PRICE 1972; HAYASE 1973; POTT 1978).

Es ist zur Zeit noch unklar, ob es sich bei diesen Enzymbanden um multiple Formen oder um weitere genetisch definierte Enzymproteine handelt.

Ähnlich wie bei anderen Enzymen wird der strukturelle Aufbau der Isoenzyme aus monomeren Untereinheiten angenommen. BEUTLER und KUHLE beschrieben 1976 den Aufbau des Isoenzyms A aus 2 alpha- und 2 beta-Untereinheiten. Für das Isoenzym B nahmen sie

4 beta-Untereinheiten an.

Etwa 60 - 70 % der Serumaktivität der β -Glucosaminidase entfallen auf das Isoenzym A (ELLIS 1975; NAKAGAWA 1977), der Rest verteilt sich auf die anderen Isoenzyme und multiplen Formen.

Die Trennung der Isoenzyme gelingt mit Hilfe der folgenden Verfahren: Ionenaustausch-Chromatographie, Sephadex-, Sepharose-Chromatographie, Elektrofokussierung in Polyacryl-amidgel-Platten, Immunabsorption und Absorption über Substratbindung (ROBINSON 1968; HAYASE 1973; WERRIES 1974; NAKAGAWA 1977; SANDHOFF 1977).

1. 6. GM_2 - G A N G L I O S I D O S E N

Das Fehlen eines oder mehrerer Isoenzyme führt zu einigen charakteristischen Krankheitsbildern.

1. 6. 1. GM_2 - G A N G L I O S I D O S E T Y P I

Bei der von dem britischen Ophthalmologen TAY und dem amerikanischen Neurologen SACHS erstmals beschriebenen GM_2 -Gangliosidose Typ I (Tay-Sachs Syndrom), einer autosomal rezessiv vererbten Sphingolipid-Speicherkrankheit, wird das Gangliosid GM_2 und sein sialsäurefreies Derivat vor allem in den Nervenzellen angehäuft, wodurch es nach der Geburt zum unaufhaltsamen, innerhalb weniger Jahre verlaufenden Abbau des Zentralnervensystems kommt (HARZER 1974).

Der bei der Tay-Sachsschen Erkrankung zugrunde liegende Stoffwechseldefekt besteht in einem völligen Fehlen des Isoenzym A der β -Glucosaminidase, das den physiologischen Abbau des Gangliosids GM_2 katalysiert (HARZER 1974).

Serumteste, die ein Fehlen oder eine Aktivitätsminderung des Isoenzym A nachweisen, sind in großem Umfang vornehmlich in den Vereinigten Staaten in Gebrauch. Besonders unter der jüdischen Bevölkerung befindet sich ein hoher Prozentsatz, der für den autosomal rezessiven Gendefekt Heterozygotie aufweist (O'BRIEN et al. 1970; KABACK/ZIEGLER 1972; LOWDEN et al. 1972; NAKAGAWA 1977).

1. 6. 2. GM_2 - G A N G L I O S I D O S E T Y P I I

Die GM_2 -Gangliosidose Typ II ist auf ein Fehlen bzw. eine Aktivitätsminderung der Isoenzyme A und B zurückzuführen. Trennt man die Isoenzyme dieser Patienten mit Hilfe der Elektrofokussierung auf, so ergibt sich ein relatives Überwiegen anderer Isoenzyme (S und P) und multipler Formen (O'BRIEN 1969).

Beide Enzymdefekte, Tay-Sachssche Erkrankung und die GM_2 -Gangliosidose Typ II, werden im Rahmen der genetischen Beratung an verschiedenen humangenetischen Zentren in der BRD untersucht (HARZER, Tübingen; SCHAUB, München).

1. 6. 3. GM_2 - G A N G L I O S I D O S E T Y P I I I

Der Enzymdefekt besteht in einer geringeren Aktivität des Isoenzym A. Die klinischen Aspekte der Krankheit treten erst im

jugendlichen Alter auf, was zu der Bezeichnung "juvenile Gangliosidose" führte (SUZUKI 1970).

1. 7. N - A C E T Y L - β - G L U C O S A M I N I D A S E U N D V E R S C H I E D E N E E R K R A N K U N - G E N

Während die Kenntnis der GM_2 -Gangliosidosen, speziell des Typs I dieser Erkrankung, durch eine Fülle von Publikationen schon längere Zeit gut bekannt ist, wurde erst in den letzten Jahren die erhöhte Serumaktivität der β -Glucosaminidase in Verbindung mit einigen anderen Krankheiten untersucht.

Nachdem WOOLLEN (1965) signifikante Serumaktivitätsanstiege bei Patienten mit Diabetes mellitus und Myokardinfarkt feststellte, befaßten sich andere Autoren mit der Untersuchung der β -Glucosaminidase bei verschiedenen Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis (KAR 1973), Polymyositis, Dermatomyositis, systemischer Lupus erythematosus (KAR 1972), Nierenerkrankungen (DANCE/PRICE 1970) oder beim induzierten haemorrhagischen Schock bei Ratten (COURTICE 1974). Auf einige interessante Ergebnisse der zitierten Arbeiten wird im Kapitel Diskussion näher eingegangen werden.

Bei der Untersuchung des katabolen Mucopolysaccharidstoffwechsels bei Lebererkrankungen fanden sich hochsignifikante Aktivitätsanstiege der β -Glucosaminidase bei akuter Hepatitis und Lebercirrhose, jedoch keine Korrelation des untersuchten Enzyms

zu Transaminasen und alkalischer Phosphatase (PLATT 1969).

NAKAMURA (1970) beschrieb in seiner Arbeit Aktivitätserhöhungen der β -Glucosaminidase bei akuten und chronischen Lebererkrankungen, speziell auch bei Hepatomen.

Weitere Untersuchungen bewiesen eine Korrelation zwischen Erhöhung der Serumaktivität und dem Grad der Mesenchymreaktion in der Leber, ausgedrückt durch den Grad des fibrotischen Umbaus (POTF 1978).

Zudem wurde nachgewiesen, daß das Isoenzym P der β -Glucosaminidase entsprechend der Aktivität der Mesenchymreaktion im Lebergewebe bei chronischen Lebererkrankungen erhöht ist. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen der Aktivität der β -Glucosaminidase und einer bestimmten chronischen Lebererkrankung (Leff 1978).

1. 8. M E T H O D E N Z U R B E S T I M M U N G D E R N - A C E T Y L - β - G L U C O S A M I - N I D A S E I M S E R U M

Für lysosomale Glykosidhydrolasen wie die β -Glucosaminidase wurden Aktivitätsbestimmungen mit Phenylglykosiden (PUGH 1957) und mit p-Nitrophenylglykosiden (WOOLLEN 1961) beschrieben. LOWDEN (1973) und DELVIN (1974) veröffentlichten Arbeiten über automatisierte Tests.

ZINTERHOFER (1976) beschrieb ein kinetisches Testverfahren.

In vielen Fällen wurden Methyl-umbelliferyl-Substrate verwandt, die jedoch zur Aktivitätsbestimmung ein Fluoreszenz-Photometer

voraussetzen.

Eine auf den Angaben von FUGH und WOOLLEN beruhende modifizierte Testvorschrift mit einem p-Nitrophenylglykosid als Substrat ist bei WERRIES, POTT, BUDDECKE (1972) beschrieben.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2. 1. GEWINNUNG UND AUFBEWAHRUNG DER SERUMPROBEN

Das zur Bestimmung der β -Glucosaminidase gewonnene, nicht heparinisierte venöse Blut stand 30 Minuten bei Zimmertemperatur und wurde danach bei 3000 U/min 15 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Serum abgezogen.

Bis zur enzymatischen Analyse der β -Glucosaminidase betrug die Dauer der Aufbewahrung bei -20°C maximal 3 Wochen.

Da wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Serumproben eine Aktivitätsminderung der β -Glucosaminidase bewirken (WOOLLEN 1965), wurden die Seren in mehrere Portionen aufgeteilt. Jede Serumprobe wurde nur einmal zur Analyse aufgetaut, der Serumrest verworfen.

2. 2. AUSWAHL DER UNTERSUCHTEN SEREN

2. 2. 1. NORMALKOLLEKTIV

Untersucht wurden 85 Seren von gesunden Personen im Alter von 17 bis 89 Jahren. Eine Unterteilung in drei Altersgruppen folgender Art erschien zweckmäßig:

Gruppe I : Normalseren ≤ 30 Jahre

Gruppe II : Normalseren 31 - 50 Jahre

Gruppe III : Normalseren ≥ 51 Jahre

Die Tabelle 1 zeigt die Geschlechts- und Altersverteilung dieser 85 Kontrollseren.

17 - 30		31 - 50		51 - 89		Altersgruppe
♂	♀	♂	♀	♂	♀	Geschlecht
21	19	10	10	9	16	Serenanzahl
40		20		25		Seren/Gruppe

Tab. 1 Geschlechts- und Altersverteilung von 85 Kontrollseren

Um Lebererkrankungen bei diesen Seren auszuschließen, wurden die Aktivitäten der Transaminasen Aspartat-Aminotransferase AST (GOT) E.C. 2.6.1.1. und Alanin-Aminotransferase ALT (GPT) E.C. 2.6.1.2. im Serum bestimmt.

Die Normalseren wurden zudem am Abnahmetag einem an der Westfälischen Wilhelms-Universitätsklinik routinemäßig durchgeführten Enzymscreening unterzogen, bei dem die folgenden Enzyme und Serumbestandteile bestimmt wurden:

	Normwert
Aspartat-Aminotransferase AST E.C. 2.6.1.1.	bis 40 U/l
Alanin-Aminotransferase ALT E.C. 2.6.1.2.	bis 40 U/l
Lactat-Dehydrogenase LDH E.C. 1.1.1.27	100 - 225 mU/ml
Alkalische Phosphatase AP E.C. 3.1.3.1.	30 - 85 mU/ml
Gesamt-Bilirubin	0,15 - 1,0 mg%
Glucose	65 - 110 mg%
Harnsäure	2,5 - 8,0 mg%
Triglyceride	40 - 220 mg%

	<u>Normwert</u>
Cholesterin	150 - 300 mg%
anorg. Phosphat	2,5 - 4,5 mg%
Gesamt-Eiweiß	6,0 - 8,0 mg%

2. 2. 2. H E R Z I N F A R K T P A T I E N T E N

Bei 30 Herzinfarktpatienten wurde die Serum- β -Glucosaminidase bestimmt. Zur Verifizierung des Herzinfarktes zogen wir den klinischen Aspekt, elektrokardiografische Untersuchungen und die enzymatische Analyse der folgenden Enzyme heran.

		<u>Normwert</u>
α -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase	α -HBDH (entspricht ca. LDH ₁ -Isoenzym)	bis 140 U/l
Aspartat-Aminotransferase	AST E.C. 2.6.1.1.	bis 40 U/l
Creatin-Kinase	CK E.C. 2.7.3.2.	10 - 70 U/l
Lactat-Dehydrogenase	LDH E.C. 1.1.1.27.	100 - 225 mU/ml
Glutamat-Dehydrogenase	G1DH E.C. 1.4.1.3.	bis 4 U/l

Die Serumproben wurden in der Zeit zwischen einer halben und maximal drei Stunden nach Eintreten des akuten Ereignisses entnommen. Weitere Enzymproben zur Bestimmung der CK wurden 12, 24 und 48 Stunden nach Eintreten des Infarktes entnommen, um die Diagnose zu stellen und zu sichern.

2. 2. 3. S C H O C K P A T I E N T E N

Aktivitätsbestimmungen wurden für die Serum- β -Glucosaminidase zudem bei 20 Schockpatienten durchgeführt. Als Kriterien des

Schocks galten die allgemein anerkannten klinischen Zeichen, der äußere Aspekt und niedrige systolische Blutdruckwerte (<90 mmHg).

2. 3. ENZYMAKTIVITÄTSBESTIMMUNG

2. 3. 1. ALLGEMEINES

Zur Bestimmung der Serumaktivität der β -Glucosaminidase wurde eine auf den Angaben nach PUGH et al. und WOOLLEN et al. beruhende Testvorschrift mit einem p-Nitrophenylglykosid verwandt. Dieser Test, von WERRIES et al. 1972 modifiziert, wurde von uns nach Messung des pH-Optimums und der Michaelis-Konstanten weiter verbessert.

2. 3. 2. STANDARDANSATZ

Verbesserter Aktivitätstest zur Bestimmung der β -Glucosaminidase im Serum.

Testansatz:

Lösung I : 0,2 ml 0,1 mol/l Citratpuffer pH 4,2 mit 0,01 mol/l
p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -Glucosaminid

Lösung II : 0,1 ml Probe a) Serum

b) gereinigtes Isoenzym A aus Leber-
homogenat-Überstand

Lösung III : 2 ml 0,4 mol/l Glycin-NaOH-Puffer pH 10,4

Durchführung des Tests:

0,9 ml Substratlösung (Lösung I) und 0,1 ml Serumlösung (bzw. gereinigte Isoenzym A-Lösung) entsprechend Lösung IIa bzw. IIb werden bei 37° C für 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 2 ml Glycin-NaOH-Pufferlösung (Lösung III) wird die Reaktion gestoppt. Die Extinktion des nun alkalisierten, gelbgefärbten p-Nitrophenols wird unter Verwendung eines Filterphotometers bei 430 nm abgelesen.*

2. 3. 3. D A R S T E L L U N G D E S G E R E I N I G - T E N I S O E N Z Y M S A

Ein gereinigtes Isoenzym A der β -Glucosaminidase stellte für weitere Untersuchungen in dankenswerter Weise Herr Priv. Doz. Dr. med. G. Pott zur Verfügung.

Die Reinigung des Enzyms erfolgte mit der Aggar-Acrylamid-Chromatographie aus dem Homogenatüberstand von Lebergewebe. Die Auftrennung geschah dann durch präparative Elektrofokussierung des Eluates. Eine Zusammenfassung findet sich bei POTT (1978). An dem gereinigten Isoenzym A wurde das pH-Optimum und die Michaelis-Konstante gemessen.

* Inzwischen ist dieser Aktivitätstest soweit verändert, daß die Extinktionsdifferenz bei 405 nm abgelesen wird. In die Berechnung geht der molare Extinktionskoeffizient für p-Nitrophenol (18,5) ein. Die im folgenden gemachten Angaben über Aktivitäten der β -Glucosaminidase sind als Extinktionsdifferenzen aufzufassen und somit dimensionslos.

2. 3. 4. BESTIMMUNG DES pH - OPTIMUMS

Zur Bestimmung des pH-Optimums der Aktivität des Gesamtzyms einiger normaler Seren, eines pathologischen Serums einer histologisch gesicherten Lebercirrhose und des gereinigten Isoenzym A wurde die Testvorschrift dahingehend geändert, daß in 3-fach-Bestimmungen über einen pH-Bereich von 3,4 bis 4,8 Substratlösungen mit pH-Sprüngen von 0,2 pH-Einheiten untersucht werden konnten.

2. 3. 5. BESTIMMUNG DER MICHAELIS - KONSTANTEN

Die Michaelis-Konstanten der bereits beim pH-Optimum erwähnten Seren wurden mit veränderten Substratkonzentrationen (siehe Ergebnisse) bei sonst unverändertem Aktivitätstest in 5-fach-Messungen bestimmt und durch Auswertung entsprechender Diagramme nach LINEWEAVER-BURK (1934) ermittelt.

2. 4. STATISTIK

Die hier angewandten statistischen Verfahren beruhen auf Angaben in Übersichtsarbeiten (WALLIS/ROBERTS 1969; WEBER 1972; STÄHLER 1977). Unter anderem wurden folgende statistische Begriffe und Verfahren untersucht:

- Grafische Darstellung der empirischen Häufigkeitsverteilung (Histogramm)

- Lagekenngrößen (arithmetischer Mittelwert $\bar{X}$, Median)
- Streuungskenngrößen (Spannweite, empirische Standardabweichung s , Quantile p)
- Asymmetriemaße (Schiefe g)
- Variationskoeffizient V
- Überprüfung der Normalverteilung entsprechender Stichproben
- t -Verteilung (Student-Test)
- Korrelationskoeffizient (Pearson)

3. E R G E B N I S S E

3. 1. N O R M A L K O L L E K T I V

Die Bestimmung der Aktivität der Serum- β -Glucosaminidase bei 85 gesunden Personen ergab die in der Tabelle 2 angegebenen Werte.

17 - 30		31 - 50		51 - 89		Alter
♂	♀	♂	♀	♂	♀	Geschlecht
379,0	375,0	205,6	207,0	203,05	357,3	Summe der Extinktionsdifferenzen
18,05	19,74	20,56	20,70	22,56	22,32	Mittelwert der Extinktionsdifferenzen
3,86	4,0	5,41	3,17	4,42	5,03	Empirische Standardabweichung s
21,4%	20,3%	26,3%	15,3%	19,6%	22,5%	Variationskoeffizient

Tab. 2 Aktivitätsbestimmung der β -Glucosaminidase im Serum bei 85 gesunden Personen.

Stellt man die der Tabelle 2 zugrundeliegende Altersverteilung grafisch dar, ergeben sich die in Abbildung 2 gezeigten Verhältnisse. Auffallend ist, daß mit zunehmendem Alter die Aktivität des Enzyms im Serum ansteigt.

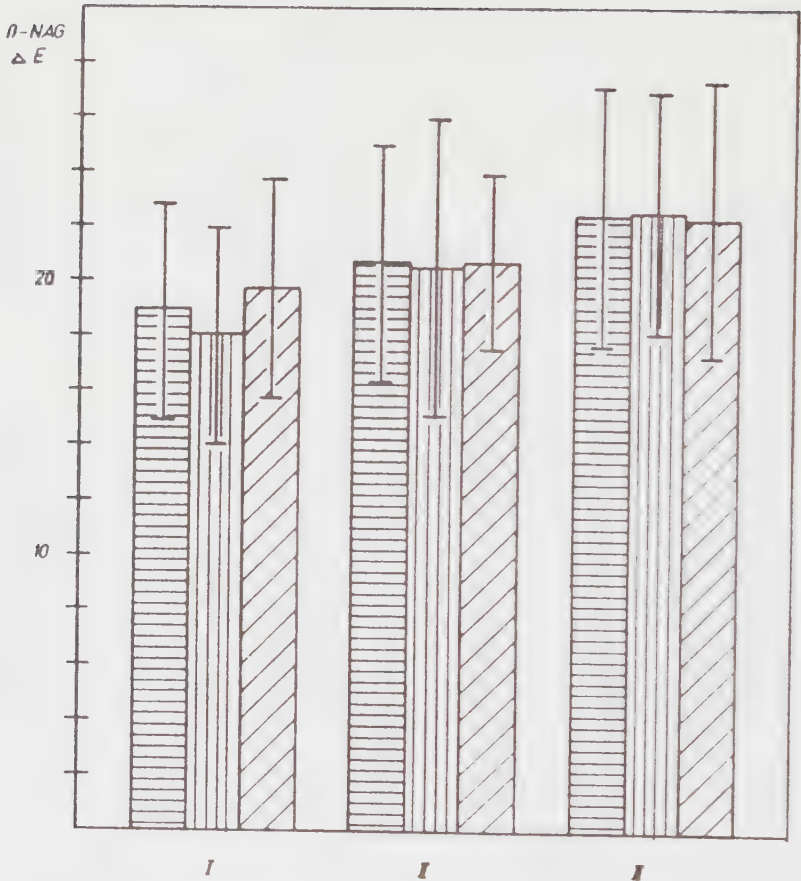


Abb. 2 Serumaktivitätsverteilung der β -Glucosaminidase bei 85 gesunden Personen.

(Die Gruppenbezeichnung gemäß der Einteilung der Tabelle 1 findet sich an der Basis der Grafik.

waagerecht schraffiert: Gesamtenzymaktivität (85 Seren)
 senkrecht schraffiert : männliche Personen (40 Seren)
 schräg schraffiert : weibliche Personen (45 Seren)

Betrachten wir zunächst alle Seren zusammen, ohne die im Abschnitt "Materialien und Methoden" angegebene Einteilung in drei Altersgruppen.

Der Mittelwert des Gesamtkollektivs errechnet sich zu $\bar{x} = 20,32$; der Median liegt bei $x_{43} = 20,5$. Die Spannweite der Daten reicht von $x_1 = 10,3$ bis $x_{85} = 29,6$. Die empirische Standardabweichung für das Gesamtkollektiv beträgt $s = 4,5$. Damit errechnet sich der Variationskoeffizient zu 22,15 %.

Um eine ungefähre Übersicht über die Verteilung der Daten zu bekommen, muß man berechnen, wieviele Seren innerhalb des Signabereiches liegen. Dabei findet man, daß 55 der 85 Seren innerhalb des 1-s-Bereiches entsprechend 64,7 % liegen und 82 der 85 Seren innerhalb des 2-s-Bereiches entsprechend 96,5 %.

Die Aktivitäten im Gesamtkollektiv zeigen zwar erhöhte Werte bei den Testseren weiblicher Probanden (Mittelwert $\bar{x} = 20,87$), diese sind aber nicht signifikant gegenüber den Testseren männlicher Probanden (Mittelwert $\bar{x} = 19,69$) verändert. Eine eindeutige unterschiedliche Geschlechtsverteilung der Serum- β -Glucosaminidase bei gesunden Personen läßt sich nicht nachweisen.

Unterteilt man nun die gewonnenen Ergebnisse in drei Altersgruppen, wie es Tabelle 1 vorsieht, so fällt auf, daß die Mittelwerte in den einzelnen Gruppen bis zur Gruppe III (51 - 89 Jahre) stetig ansteigen.

Bei Berücksichtigung männlicher und weiblicher Seren und entsprechender Unterteilung in drei Altersgruppen findet man innerhalb der Gruppe I erhöhte Aktivitätswerte bei den weiblichen Testpersonen gegenüber den männlichen. Die Aktivitäten des Serumenzymes in den Gruppen II und III bleiben jedoch auch bei

entsprechender Unterteilung in männliche und weibliche Probanden gleich.

Um für weitere Untersuchungen an Herzinfarkt- und Schockpatienten einen Normalbereich der Serumaktivität des Enzyms festzulegen, prüften wir, ob es sich bei den 85 Seren um ein normal verteiltes Kollektiv handelt.

Bei Eintragung der relativen Summenhäufigkeiten ergab sich im Wahrscheinlichkeitspapier eine Gerade. Diese spricht für normal verteilte Variablen. Als obere Grenze des Normwertes der β -Glucosaminidase im Serum erschien der 2-s-Wert zweckmäßig. Dieser obere Grenzwert beträgt für das Normalkollektiv den Wert 29,32 . Serumaktivitäten, die oberhalb dieses Wertes liegen, müssen als pathologisch bezeichnet werden.

3. 2. HERZINFARKTPATIENTEN

Aktivitätsbestimmungen bei Herzinfarktpatienten ergaben die in Tabelle 3 und Abbildung 3 aufgeführten Ergebnisse.

Mittelwert $\bar{x}$	30,4	$\bar{x}^A$	28,9
Median $x_{15,16}$	26,25		
Spannweite $x_1 - x_{30}$	73,7 - 17,1		
Empirische Standardabweichung s	11,97	s^A	8,93
Variationskoeffizient V	39,3 %	V^A	30,9 %

Tab. 3 Statistische Ergebnisse bei 30 Herzinfarktpatienten.
Serumaktivität der β -Glucosaminidase.

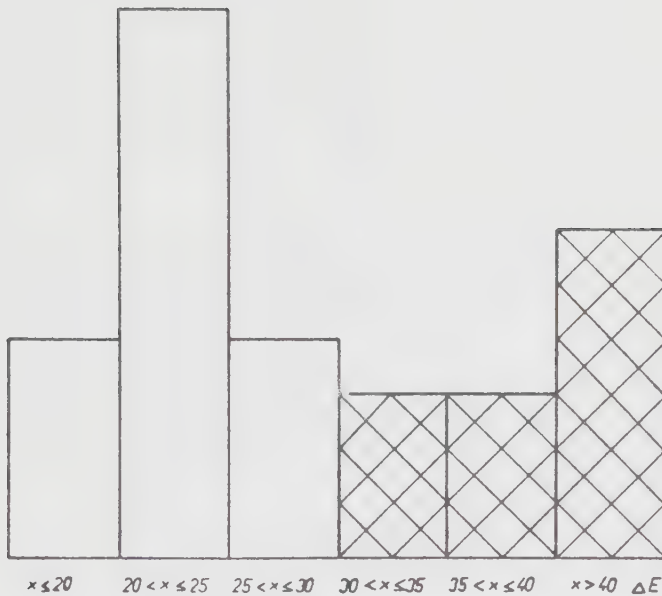


Abb. 3 Grafische Darstellung der empirischen Häufigkeitsverteilung der Serum- β -Glucosaminidase bei 30 Herzinfarktpatienten. Der Bereich der nicht schraffierten Fläche gibt den Normbereich des Enzyms an.

Die im Bereich der nicht schraffierten Fläche liegenden Werte sind als Seren mit normaler Serumaktivität der β -Glucosaminidase anzusehen. Die außerhalb liegenden Werte müssen als pathologisch beurteilt werden (Dies sind 40 % der Seren).

Die Tabelle 3 gibt Auskunft über die Lagekenngrößen Mittelwert und Median, sowie über die Streuungskenngrößen Spannweite, empirische Standardabweichung und den Variationskoeffizienten. Die erhaltenen Daten waren nicht normalverteilt.

Der Wert x_{30} bedarf einer besonderen Wertung, da er im Sinne der Statistik als Ausreißer zu beurteilen ist. Verzichtet man auf diesen Wert, so ergeben sich die in vorgenannter Tabelle angegebenen Werte für Mittelwert, empirische Standardabweichung und Variationskoeffizienten, die mit einem * gekennzeichnet sind. Bei der Beurteilung stützen wir uns auf die so korrigierten Werte.

Da 40 % der Aktivitätswerte der Serum- β -Glucosaminidase bei Herzinfarktpatienten außerhalb des Normbereiches liegen, und der Mittelwert mit $\bar{x}^* = 28,9$ weit über dem des Normalkollektivs ($\bar{x} = 20,32$) liegt, muß davon ausgegangen werden, daß die Serumaktivität des Enzyms bei Herzinfarktpatienten im Vergleich zum Gesunden erhöht ist.

3. 3. S C H O C K P A T I E N T E N

Untersuchungen bei Schockpatienten ergaben die in Tabelle 4 und Abbildung 4 gezeigten Ergebnisse.

Mittelwert $\bar{x}$	30,5
Median $x_{10,11}$	31,5
Spannweite $x_1 - x_{20}$	42,5 - 21,3
Empirische Standardabweichung s	5,7
Variationskoeffizient V	18,7 %

Tab. 4 Statistische Ergebnisse bei 20 Schockpatienten.
Serumaktivität der β -Glucosaminidase.

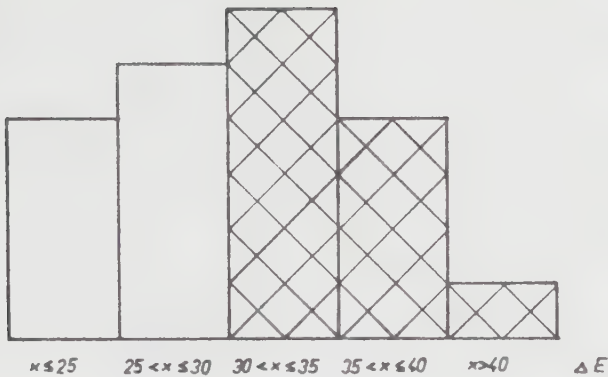


Abb. 4 Grafische Darstellung der Serum- β -Glucosaminidase-Aktivität bei 20 Schockpatienten.

Der Bereich der nicht schraffierten Fläche gibt den Normbereich des Enzyms an.

55 % der ermittelten Werte liegen außerhalb des Normbereichs. Der Mittelwert, der wie oben erwähnt im Normalkollektiv bei $\bar{x} = 20,32$ liegt, errechnet sich bei Schockpatienten zu $\bar{x} = 30,5$. Dies spricht für eine Erhöhung der β -Glucosaminidase im Serum bei verschiedenen Arten des Schocks. Eine Normalverteilung lag auch hier nicht vor.

3. 4. MICHAELIS - KONSTANTEN

Die ermittelten Michaelis-Konstanten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten näherungsweise überein. Eine Übersicht über einige von anderen Autoren gefundenen Michaelis-Konstanten findet sich im Abschnitt "Diskussion der Ergebnisse".

Die Abbildung 5 zeigt die nach LINEWEAVER-BURK dargestellten Michaelis-Konstanten in doppelt reziproker Auftragung für drei Normalseren N_1 , N_2 , N_3 , ein pathologisches Serum P einer histologisch gesicherten Lebercirrhose mit sehr hoher Serumaktivität (> 40) und das aus Lebergewebe isolierte Isoenzym A der β -Glucosaminidase.

Die drei Normalseren ergaben ein identisches K_m von 0,98 mM, das pathologische Serum führte zu einem K_m -Wert von 0,90 mM. Für das Isoenzym A wurde der Wert $K_m = 0,95$ mM ermittelt.

3. 5. P H - O P T I M U M

Abbildung 6 schließlich zeigt die Darstellung der pH-Optima der oben angegebenen Seren. Für das pH-Optimum ergab sich bei allen untersuchten Seren ein Wert von pH 4,2 .

Besonderheiten traten beim Serum N_1 auf (Abb. 6a). Der Anstieg der Kurve im linken Teil verläuft nicht typisch.

Deutlicher noch zeigt die Bestimmung des pH-Optimums des Serums N_2 (Abb. 6b), daß ein zweigipfliges pH-Optimum vorhanden ist. Dabei liegt der höchste Punkt der Kurve bei pH 4,2 . Der zweite etwas niedrigere Aktivitätsgipfel dieses Serums bei pH 3,6 und das nicht so deutliche Ansteigen der Aktivität im Anfangsteil der Kurve des Serums N_1 sind wahrscheinlich dadurch bedingt, daß andere Isoenzyme der β -Glucosaminidase ihren Beitrag zum pH-Optimum liefern. Das pH-Optimum des Serums N_3 wurde aus methodischen Gründen nicht bestimmt.

Das pathologische Serum P (Abb. 6c) zeigt dagegen kein eindeu-

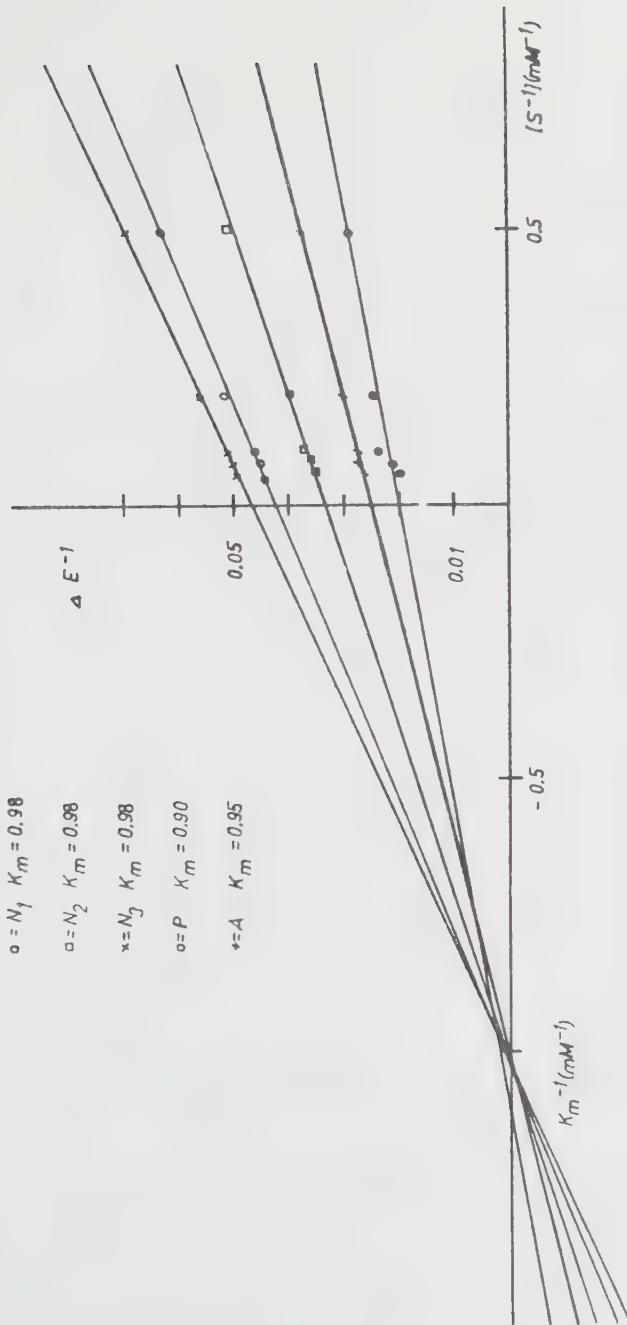


Abb. 5 Michaelis-Konstanten der Serum-β-Glucosaminidase

N_1, N_2, N_3 : Normalseren

P : pathologisches Serum (siehe Text)

A : Isoenzym A (siehe Text)

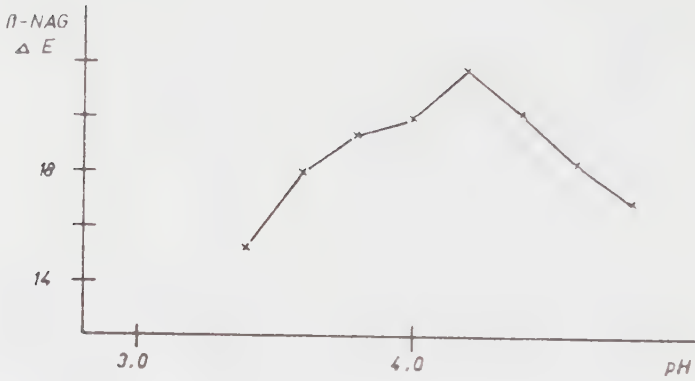


Abb. 6a PH-Optimum der Serum- β -Glucosaminidase,
Serum N₁ .

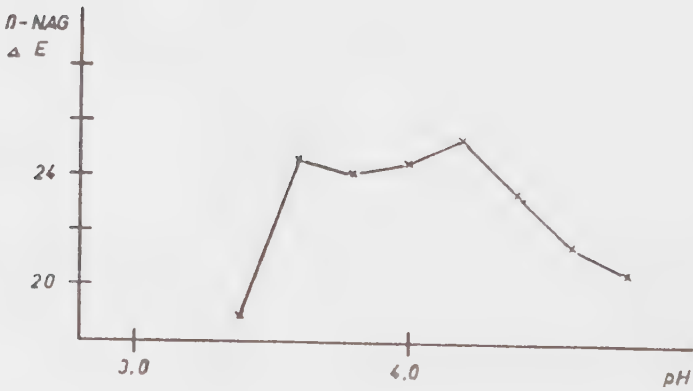


Abb. 6b PH-Optimum der Serum- β -Glucosaminidase,
Serum N₂ .

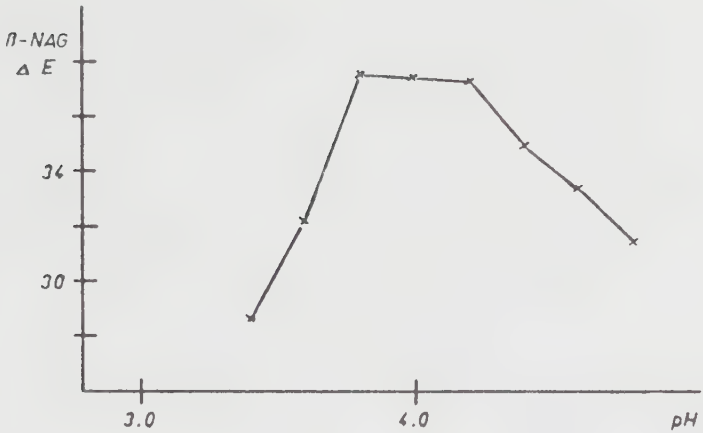


Abb. 6c PH-Optimum der Serum-B-Glucosaminidase,
Serum P .

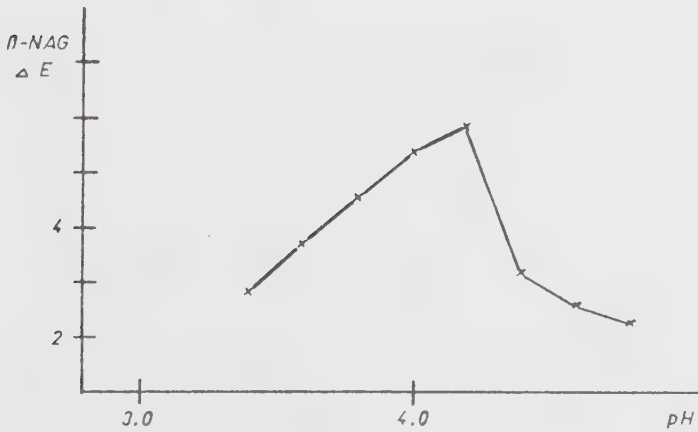


Abb. 6d PH-Optimum der B-Glucosaminidase,
Isoenzym A

tiges pH-Optimum, sondern führt zu einem Plateau im Bereich von pH 3,8 bis pH 4,2 . Auch dieser Sachverhalt kann durch ein unterschiedliches Isoenzymmuster interpretiert werden.

Das gereinigte Isoenzym A (Abb. 6d) schließlich präsentiert ein gewohntes Bild. Das pH-Optimum liegt wiederum bei pH 4,2 . Zu beachten ist der Bereich pH 4,2 - 4,8 . Da der Verlauf der Kurve in diesem Bereich nicht glockenförmig ist, sondern bereits in diesem kleinen pH-Bereich ein starker Aktivitätsverlust auftritt, könnte es sich hierbei um ein Indiz dafür handeln, daß das Isoenzym A noch weitere Untereinheiten mit unterschiedlichen pH-Optima enthält.

3. 6. K O R R E L A T I O N S A N A L Y S E N

Im Rahmen des allgemeinen Enzymscreenings an der Westfälischen Wilhelms-Universitätsklinik Münster wurden in den 85 Normalseren die Aktivitäten der im Abschnitt 2.2.1. aufgeführten Enzyme und Serumbestandteile bestimmt, sowie ihr Verhalten im Vergleich zur Aktivität der β -Glucosaminidase untersucht. Bei keinem der angeführten Enzyme und Serumbestandteile fand sich eine Korrelation zur Aktivität der β -Glucosaminidase.

Bei der klinischen Untersuchung von Herzinfarktpatienten wurden die im Abschnitt 2.2.2. aufgeführten Serumenzyme bestimmt. Keines der untersuchten Serumenzyme zeigte eine signifikante Korrelation zur Serumaktivität der β -Glucosaminidase bei Herzinfarktpatienten.

Da es sich bei den Schockpatienten zumeist um ein akut lebens-

bedrohliches Ereignis handelte, war es nicht immer möglich, Serum für Enzymanalysen zu erhalten. Eine Aussage kann nur über die Aspartat-Aminotransferase und die Alanin-Aminotransferase gemacht werden, die in allen 20 Fällen bestimmt wurden. Bei beiden Enzymen zeigte sich keine signifikante Korrelation zur Serum- β -Glucosaminidase-Aktivität.

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.1. ALTERSVERTEILUNG

Studiert man die Literatur bezüglich der Altersverteilung der β -Glucosaminidase-Aktivität im Serum, so ergeben sich widersprechende Ergebnisse.

Bereits 1965 wies WOOLLEN darauf hin, daß die Aktivität des Enzyms im Serum des Menschen mit zunehmendem Alter ansteigt. Er stützte seine Beobachtungen auf die Seren von 69 männlichen und 79 weiblichen gesunden Testpersonen.

PLATT hatte 1970 180 Seren gesunder Probanden zur Verfügung, die er in sechs Altersgruppen unterteilte. In der Altersgruppe bis zu einem Jahr fällt eine hohe Serumaktivität des Enzyms auf, die bis zur Altersgruppe der 1.-15.-jährigen abfällt, um dann bis zum 80. Lebensjahr einen signifikanten Aktivitätsanstieg ($p < 0,05$) aufzuweisen.

Diese Ergebnisse stimmen gut mit den in dieser Arbeit vorgelegten überein.

Andere Autoren (O'BRIEN 1970; BELFIORI et al. 1974; WELMAN 1978) fanden in ihren Untersuchungen diesen Aktivitätsanstieg der Serum- β -Glucosaminidase mit zunehmendem Alter nicht.

Auch die vorliegende Arbeit kann diesen Unterschied in den Meßergebnissen der einzelnen Untersucher nicht erklären. Hinzuweisen ist jedoch auf die Zahl der Kontrollseren, die in den ein-

zelnen Arbeiten verwandt wurden, sowie auf die sich daraus ergebenden Schwierigkeiten, über kleine Stichproben statistisch begründbare Aussagen machen zu können.

O'BRIEN (1970) untersuchte lediglich 33 Seren gesunder Probanden im Alter von 3 - 43 Jahren, und in der Arbeit "Plasma lyso-somale Enzymaktivität bei akutem Myokardinfarkt" besteht das Kontrollkollektiv lediglich aus 40 Seren gesunder Personen (WELMAN 1978). Die geringe Anzahl der Kontrollseren in den beiden zuvor genannten Arbeiten könnte ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den Sachverhalt liegt vielleicht in der Tatsache, "daß von den einzelnen Autoren verschiedene Substrate, Substratkonzentrationen und unterschiedliche Meßmethoden benutzt wurden" (WELMAN 1978).

Doch zeigt sich, daß die am häufigsten verwendeten Substrate 4-methyl-umbelliferyl- und p-nitrophenyl- β -D-N-Glucosaminid übereinstimmende Ergebnisse in Bezug auf kinetische Parameter wie Michaelis-Konstante und pH-Optimum liefern, und somit die mit unterschiedlichen Substraten erhaltenen Ergebnisse gut vergleichbar sind (KANFER 1973).

Der Einwand, "daß WOOLLEN (1965) mit Substratkonzentrationen von $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l unterhalb der K_m ($= 8,3 \times 10^{-4}$ mol/l) des Enzyms arbeitete" (WELMAN 1978), gilt zwar für diese Veröffentlichung. PLATT (1970) setzte aber in seiner Untersuchung Substratkonzentrationen ein, die nahe bei der K_m lagen, so daß auch niedrige Substratkonzentrationen nicht die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich ansteigender Serumaktivität im Alter erklären können.

Auf den Einfluss verschiedener enzymatischer Meßmethoden, die die Vergleichbarkeit der Resultate einzelner Autoren beeinträchtigen könnten, wird im Abschnitt "Kinetische Parameter" noch genauer eingegangen.

Erwähnt sei abschließend, daß sich bei der Untersuchung der Enzymaktivität der β -Glucosaminidase im menschlichen Gehirn mit zunehmendem Alter ebenfalls ein Anstieg der Gesamtaktivität des Enzyms zeigt. Das Verhältnis der Isoenzyme A und B zueinander, welches in der jüngsten Gruppe (0 - 5 Jahre) einen höheren prozentualen Anteil des Isoenzym A aufweist, führt mit zunehmendem Alter zu einer ständigen Erhöhung des Isoenzym B, so daß in der ältesten Gruppe (41 - 85 Jahre) das Verhältnis A zu B sich wie 1 : 1 verhält (HARZER 1971).

Bei der Untersuchung von Leichenleber, -niere und -nebenniere fanden sich signifikante bis hochsignifikante Aktivitätsanstiege des Enzyms von der Geburt an bis zum 80. Lebensjahr (PLATT 1970).

Die in den beiden genannten Untersuchungen (PLATT 1970; HARZER 1971) gemessenen Aktivitäten stellen Messungen der Gesamtaktivität (gebundene + freie lysosomale Aktivität) dar.

Von ausschlaggebender Bedeutung für den Abbau der Glycosaminoglykane ist jedoch allein diejenige Enzymmenge, die nach Austritt aus den Lysosomen in den Extrazellularraum gelangt und die hier liegenden Substrate abbaut. Eine getrennte Bestimmung der gebundenen und freien Aktivität ist jedoch an Leichenorganen nicht möglich, da durch eine längere Lagerung der Organe infolge einer gesteigerten Durchlässigkeit der Lysosomenmembran die freie Aktivität ansteigt. Physiologischerweise liegt der

größeren Anteil der Enzyme in gebundener Form vor. Eine Aussage über den katabolen Mucopolysaccharidstoffwechsel ist nur bedingt möglich. So kann durchaus bei konstanter lysosomaler Gesamtaktivität ein gesteigerter Abbau stattfinden, falls der freie wirksame Enzymanteil erhöht ist. Andererseits ist bei einer gesteigerten Gesamtaktivität eine unveränderte Abbaurate zu erwarten, wenn die freie Enzymmenge konstant bleibt. Die Aktivitätsmessungen im Serum könnten eine Aussage über die freien Enzymaktivitäten in Geweben möglich machen, falls diese ins Serum gelangen.

Da bei vielen Erkrankungen eine Mitbeteiligung des Mesenchyms bekannt ist, jedoch Enzymaktivitätsmessungen in menschlichen Organen nur bedingt möglich sind, können Aktivitätsänderungen im Serum Hinweise liefern. Für Aktivitätsbestimmungen müssen die signifikanten altersabhängigen Änderungen der β -Glucosaminidase berücksichtigt werden" (PLATT 1970).

4. 2. G E S C H L E C H T S V E R T E I L U N G

Zu der Frage der Geschlechtsverteilung der Serumaktivität der β -Glucosaminidase findet sich in der Literatur die übereinstimmende Meinung, daß das Enzym geschlechtsunabhängig verteilt ist (WOOLLEN 1965; NAKAMURA 1970; O'BRIEN 1970; WELMAN 1978).

In dieser Untersuchung findet sich bei 85 gesunden Probanden ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied in der

Serumenzymaktivität zwischen männlichen und weiblichen Testpersonen.

Allerdings fällt auf, daß in der Gruppe I (17 - 30 Jahre) die Seren weiblicher Probanden im Vergleich zu den männlichen wesentlich höhere Aktivitäten zeigen. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt bietet sich, wenn man berücksichtigt, daß in dieser Altersgruppe eine verhältnismäßig große Anzahl weiblicher Testpersonen hormonale Kontraceptiva einnehmen.

In einer Untersuchung über Interaktionen zwischen hormonalen Kontraceptiva und der Serumaktivität der β -Glucosaminidase wurde gezeigt, daß zwar im Kurzzeitversuch bei Einnahme von Eugynon[®] (SCHERING AG, Berlin) die Serumaktivität der β -Glucosaminidase gegenüber Kontrollseren nicht erhöht war, nach einem halben Jahr Einnahme des genannten Präparates sich jedoch signifikante Aktivitätssteigerungen des Enzyms fanden. Die Serumaktivitäten der Transaminasen (AST und ALT) lagen im Normbereich (PLATT 1973).

Bei der Überprüfung des Kontrollkollektivs ergibt sich, daß in der Gruppe I 8 der 19 weiblichen Testpersonen hormonale Kontraceptiva zum Zeitpunkt der Untersuchung über einen Zeitraum von mehr als einem halben Jahr einnahmen. Dies entspricht 42,1 % der weiblichen Probanden dieser Gruppe. Untersucht man die bei diesen Frauen gefundenen Serumaktivitäten der β -Glucosaminidase, so findet man, daß bei allen 8 Seren die Enzymaktivitäten über dem für diese Gruppe ermittelten Mittelwert ($\bar{x} = 19,74$) liegen. Es wäre falsch, die erwähnten 8 Seren aus dem Normalkollektiv herauszunehmen, da ihre Enzymaktivitäten trotz der erhöhten Werte noch im Normalbereich liegen. Allerdings ist bei der Beurteilung der Serumaktivität der β -Glucosaminidase speziell bei

Werten, die im oberen Normbereich liegen, zu berücksichtigen, ob hormonale Kontraceptiva eingenommen wurden.

4. 3. K I N E T I S C H E P A R A M E T E R

4. 3. 1. A L L G E M E I N E S

Will man die in der Literatur angegebenen Werte für das pH-Optimum, die Michaeliskonstante und andere interessante kinetische Parameter der β -Glucosaminidase vergleichen, stößt man auf die Schwierigkeit, daß zum Nachweis der Serumaktivität des Enzyms unterschiedliche enzymatische Meßmethoden verwendet wurden.

Im folgenden sollen einige Faktoren besprochen werden, die einen möglichen Einfluß auf die Genauigkeit der gemessenen Aktivitäten haben. Im Anschluß daran soll gezeigt werden, inwieweit die mit unterschiedlichen Meßmethoden erhaltenen Werte für pH-Optimum, Michaeliskonstante und andere Enzymeigenschaften vergleichbar sind.

4. 3. 2. E I N F L U ß A L L G E M E I N E R P A R A - M E T E R

4. 3. 2. 1. A U S W A H L D E S N O R M A L - K O L L E K T I V S

Bei Auswahl des Normalkollektivs ist wegen der bekannten Aktivitätsanstiege der Serum- β -Glucosaminidase bei Lebererkrankungen darauf zu achten, diese mit Hilfe der üblichen Enzymdiagnos-

tik herauszufiltern. Die Bestimmung der ASF und ALF bietet dazu eine gute Möglichkeit.

Da die Einnahme steroidhaltiger Medikamente die Serumaktivität verändert, muß, wie bereits für die hormonalen Kontraceptiva erwähnt, das Normalkollektiv auf derartige Fälle untersucht werden. In einzelnen Fällen wird sich der Ausschluß der Seren, die besonders hohe Aktivitäten zeigen und so das Normalkollektiv verfälschen, nicht umgehen lassen. Erhöhte und damit für normale Enzymaktivität nicht repräsentative Werte findet man auch bei einigen weiteren Krankheiten, die weiter unten besprochen werden.

In der Schwangerschaft finden sich Aktivitätsanstiege der β -Glucosaminidase in Abhängigkeit von der Dauer der Schwangerschaft. Dieser Befund hängt mit der in der Schwangerschaft veränderten hormonalen Situation zusammen (DOFFOEL 1975).

4. 3. 2. 2. B L U T E N T N A H M E

Von einigen Autoren wird heparinisiertes Blut zur Messung der Serumaktivität benutzt. Um Interaktionen zwischen Heparin und der β -Glucosaminidase zu vermeiden, ließen wir das Blut im sterilen Röhrchen koagulieren und pipettierten das überstehende Serum nach Zentrifugation zur Messung ab.

4. 3. 2. 3. A U F B E W A H R U N G U N D V E R W E N - D U N G D E S S E R U M S

Das so erhaltene Serum wurde nur einmal zur enzymatischen Analyse verwandt, da wiederholtes Frieren und Tauen zu einem Akti-

vitätsverlust führt (WOOLLEN 1965).

Die Aufbewahrung des Serums geschieht zweckmäßigerweise bei -20°C . Die Zeit, in der das Enzym bei dieser Temperatur eine Aktivitätsminderung erleidet, wird sehr unterschiedlich angegeben, doch dürfte die Bestimmung innerhalb von 3 Wochen ausreichend sein, um einen Aktivitätsverlust des Enzyms zu vermeiden (WELMAN 1978).

4. 3. 3. DISKUSSION DER MEßMETHODE

Im folgenden sollen einige Faktoren benannt werden, die, abhängig von der Meßmethode, das Ergebnis einer Enzymmessung im Serum beeinflussen können. Außerdem soll gezeigt werden, inwieweit Meßdaten über das pH-Optimum und die Michaelis-Konstante in den einzelnen Arbeiten vergleichbar sind.

4. 3. 3. 1. EINFLUSS DES PUFFERSYSTEMS

Versetzt man einen Testansatz mit steigenden Konzentrationen eines Citratpuffers (1,5 mM - 25 mM), so zeigen sich keine Unterschiede in den gemessenen Aktivitäten.

Das Hinzufügen von Phosphat führt zu einer geringen Aktivitätshemmung, die bei einer Konzentration von 20 mM 20 % betragen kann.

Der Einfluß eines Acetatpuffersystems ist wesentlich ausgeprägter. Eine Konzentration von 20 mM Acetat führt zu einer 80-prozentigen Aktivitätshemmung (ROBINSON 1968).

Der Citratpuffer ist aus diesem Grunde den beiden anderen Puffersystemen zur Serumaktivitätsbestimmung vorzuziehen.

4. 3. 3. 2. EINFLUSS VON pH-VERÄNDERUN- GEN

Untersucht man den Einfluß von pH-Veränderungen auf die Aktivität der β -Glucosaminidase, so ergibt sich, daß die Isoenzyme A und B ein unterschiedliches Verhalten zeigen. Isoenzym B ist über einen weiten pH-Bereich zwischen pH 3 bis pH 7 hinweg stabil, während das Isoenzym A schnell denaturiert wird, wenn der pH der Lösung um mehr als eine Einheit vom pH-Optimum variiert (ROBINSON 1968).

Die für das pH-Optimum gemessenen Werte hängen sowohl von der eingesetzten Substratkonzentration, als auch von den verwendeten Substraten ab. So ergibt sich bei dem Substrat 4-methylumbelliferyl- β -D-N-Glucosaminid bei einer Konzentration von 0,264 mM ein pH-Optimum von 5,0 für die Gesamt- β -Glucosaminidase. Bei Verwendung einer Substratkonzentration von 2,11 mM jedoch ein pH-Optimum von 4,6 (LEABACK 1961).

Setzt man als Substrat ein p-nitrophenyl-Derivat ein, findet man pH-Optima von 4,4 - 4,8 (BOROOAH et al. 1961).

Die Diskussion der von anderen Autoren ermittelten pH-Optima wird unten weiter fortgeführt.

4. 3. 3. 3. EINFLUSS DER INKUBATIONSZEIT

Allgemein wird bei Bestimmung der β -Glucosaminidase-Aktivität eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37° C für ausreichend gehalten. Die Extinktionsdifferenz steigt bis 180 Minuten linear an. Daher ist es möglich, Proben mit geringerer Enzymaktivität einer längeren Inkubationszeit zu unterziehen (POTT 1979).

4. 3. 3. 4. EINFLUSS DES GEWÄHLTEN SUBSTRATES

Die am häufigsten gebrauchten Substrate zur Bestimmung der β -Glucosaminidase-Aktivität sind:

- 4-methyl-umbelliferyl- β -D-N-acetylglucosaminid (4-MU-GluNAc) und
- p-nitrophenyl- β -D-N-acetylglucosaminid (pNP-GluNAc)

Bei Verwendung dieser beiden Substrate für kinetische Untersuchungen sind keine auffälligen Unterschiede zwischen beiden Substraten bezüglich der Michaelis-Konstanten beschrieben worden. Auch die unterschiedlich angegebenen pH-Optima sind nicht unbedingt auf unterschiedliche Substrate, sondern eher wohl auf verschiedene Substratkonzentrationen zurückzuführen. Untersucht man die β -Glucosaminidase-Aktivität in menschlichen Hautfibroblasten, indem man beide Substrate zur Messung einsetzt, ergeben sich für das 4-MU-GluNAc und für das pNP-GluNAc identische Michaelis-Konstanten von 0,83 mM (KANFER 1973).

4. 3. 3. 5. EINFLUSS DER SUBSTRAT- KONZENTRATION

Nach Möglichkeit werden Enzymaktivitäten im Bereich des Substratüberschusses gemessen. Um diejenige Substratkonzentration zu berechnen, die zum Erreichen maximaler Reaktionsgeschwindigkeit notwendig ist, wird im allgemeinen das 100fache der Michaelis-Konstanten K_m eingesetzt. Bei Verwendung des Substrates p-nitrophenyl- β -D-N-Glucosaminid im Testansatz zeigt sich, daß bei Substratkonzentrationen über 0,015 mol/l eine kompetitive

Hemmung des Enzyms eintritt. Hemmung durch Substratüberschuss und die bei dieser Konzentration verminderte Löslichkeit des Substrates begrenzen hier die Wahl einer möglichst hohen Substratkonzentration (POTF 1979).

4. 3. 3. 6. EINFLUSS VON INHIBITOREN UND AKTIVATOREN

Auf den Einfluß von Heparin auf die gemessenen Serumaktivitäten wurde bereits kurz eingegangen. CAYGILL berichtete 1966, daß Heparin und andere saure Mucopolysaccharide sehr potente Inhibitoren der β -Glucosaminidase sind. Diese Hemmung des Enzyms kann durch Zugabe von Calciumchloridlösung nur teilweise rückgängig gemacht werden (ROBINSON 1968). Heparin sollte also bei Entnahme des zur Serumbestimmung entnommenen Blutes nicht zugesetzt werden.

Eine Vielzahl von metallischen Ionen führt in einem Teil der Untersuchungen zu irreversibler Hemmung der Enzymaktivität. Dies ist z.B. bei Hg^{2+} - und Ag^{+} -Ionen der Fall (VERPOORTE 1974). Eine Übersicht über den Einfluß einiger anderer Ionen auf die Aktivität der β -Glucosaminidase gibt KOLODNY (1976). Eine Erhöhung der Aktivität bewirken auch eine ganze Reihe von verschiedenen Proteinen. Zu diesen gehört u.a. das menschliche Serumalbumin sowie bovines Serumalbumin, mit dem noch höhere Aktivitäten erzielt werden können.

4. 3. 4. AUSWAHL DER METHODEN

Zur Aktivitätsbestimmung der β -Glucosaminidase im Serum wurde

als Substrat das p-Nitrophenyl- β -D-N-acetylglucosaminid ausgewählt. Das häufig eingesetzte Substrat 4-Methyl-umbelliferyl- β -D-N-acetylglucosaminid ergibt zwar höhere Extinktionen, setzt aber das Vorhandensein eines Fluoreszenz-Photometers voraus (WOOLLEN 1965).

Läßt man im Testansatz das Enzym bei pH 4,2 entsprechend dem pH-Optimum reagieren, kann man gegenüber früheren Angaben zum Aktivitätstest der β -Glucosaminidase im Serum (COTLIER 1972; CONOVER et al. 1973; ROSENBERG und CUTLER 1974; MOLZER und BERNHEIMER 1976) zu einer 15 - 20 % Aktivitätserhöhung bei der Messung der β -Glucosaminidase im Serum gelangen (POTT 1979). Bei der Untersuchung der Serumproben mit dem Photometer (z.B. EPPENDORF, LANGE, RIEDEL) zeigt der Übergang von 430 nm auf 405 nm höhere Extinktionsdifferenzen, weshalb wir uns entschlossen, die Messung der Enzymaktivität künftig bei 405 nm vorzunehmen.

4. 3. 5. BESTIMMUNG DES pH - O P T I M U M S

Bei der Bestimmung des pH-Optimums der Gesamtserumaktivität der β -Glucosaminidase ergab sich in allen untersuchten Seren der übereinstimmende Wert von pH 4,2. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den pH-Optima, die von anderen Untersuchern ermittelt wurden.

Zusammenstellung der von verschiedenen Untersuchern gemessenen pH-Optima der β -Glucosaminidase im Serum:

- pH 4,7 - 4,8	Substrat 4-MU ¹⁾	WOOLLEN	1965
- pH 4,3	Substrat p-NP	CAYGILL	1965
- pH 4,4	Substrat 4-MU	O'BRIEN	1970
- pH 4,5	Substrat 4-MU	STIRLING	1972 ²⁾
- pH 4,2	Substrat 4-MU	Tettamanti	1977

Anm.: 1) 4-MU wird als Abkürzung für 4-Methyl-umbelliferyl- β -D-N-acetylglucosaminid und p-NP als Abkürzung für p-Nitrophenyl- β -D-N-acetylglucosaminid verwandt.

2) Die Angaben bei STIRLING (1972) beziehen sich auf Seren von Schwangeren. Der Wert pH 4,5 gilt für die Isoenzyme A und P.

WOOLLEN (1965) gibt für das pH-Optimum den Wert von 4,7 - 4,8 an. Dieser Wert weicht von denen anderer Autoren deutlich ab und könnte auf die in der benutzten Meßmethodik niedrige Substratkonzentration von $2,6 \times 10^{-5}$ mol/l zurückzuführen sein. Das aus Lebergewebe isolierte Isoenzym A der β -Glucosaminidase zeigt in der vorliegenden Untersuchung dasselbe pH-Optimum wie die Gesamt- β -Glucosaminidase im Serum (pH 4,2).

Zahlreiche Untersucher haben das Enzym aus den verschiedenartigsten menschlichen Geweben isoliert. Betrachtet man im Zusammenhang die pH-Optima dieser derartig gewonnenen β -Glucosaminidase, so scheinen sie im Vergleich zu dem im Serum gemessenen Wert etwas höher zu liegen.

Die folgende Zusammenstellung soll anhand einiger Beispiele die in verschiedenen menschlichen Geweben gemessenen pH-Optima der β -Glucosaminidase zeigen.

pH	4,3	Leukocyten/Synovia	Substrat	p-NP	CAYGILL	1965
pH	4,5	Niere	Substrat	4-MU	DANCE	1969
pH	5,5 - 6,2	polymorphkernige Leukocyten	Substrat	p-NP	AVILA	1973
pH	4,0	Hautfibroblasten	Substrat	p-NP 4-MU	KANFER	1973
pH	4,5	Leber/Gehirn	Substrat	4-MU	BRAIDMAN	1974 ¹⁾
pH	5,0 - 6,0	Leber/Gehirn	Substrat	4-MU	BRAIDMAN	1974 ²⁾
pH	4,5	Amnionzellkultur	Substrat	p-NP	HULTBERG	1976
pH	4,5	Leukocyten	Substrat	4-MU	KOLODNY	1976
pH	4,6 - 4,8	B und T Lympho- cyten	Substrat	4-MU	CROCKARD	1979

Anm.: 1) Diese Angaben beziehen sich auf das Isoenzym B

2) Diese Angaben beziehen sich auf das Isoenzym C

Bei der Untersuchung eines pathologischen Serums mit histologisch gesicherter Lebercirrhose gelang es nicht, ein eindeutiges pH-Optimum der Gesamtserumaktivität des Enzyms zu erhalten, da sich im Bereich von pH 4,2 bis 4,6 ein Plateau zeigte. Während beim Gesunden die Gesamt- β -Glucosaminidase zu 60 - 70 % aus dem Isoenzym A besteht, findet man bei Lebererkrankungen einen relativ höheren Prozentanteil anderer Isoenzyme, z.B. des Isoenzyms P (I) (POTT 1978). Für das pH-Optimum des Isoenzyms P wird ein Wert von pH 4,5 angegeben (STIRLING 1972). Der in Abbildung 6c gezeigte Kurvenverlauf könnte unter anderem durch den Einfluß dieses Isoenzyms entstanden sein.

4. 3. 6. BESTIMMUNG DER MICHAELIS - KONSTANTEN K_M

Die Michaelis-Konstante K_M wurde ermittelt, um die im Testansatz

einzusetzende Substratkonzentration möglichst exakt zu wählen, und damit die Aussagefähigkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Die Gesamt- β -Glucosaminidase im Serum ergibt ein K_m von 0,98 mM bei gesunden Personen. In dieser Größenordnung liegen auch die von anderen Autoren angegebenen Werte.

Die folgende Zusammenstellung gibt einige Beispiele für die in anderen Untersuchungen ermittelten K_m - Werte. Gemessen wurde jeweils die Serumaktivität des Enzyms.

K_m (mM)	Substrat	Autor	Jahr	Besonderheiten
0,82	p-NP	CAYGILL	1965	--
0,78	4-MU	WOOLLEN	1965	--
1,2	4-MU	TETTAMANTI	1977	--
0,69	4-MU	PRICE	1972	Isoenzym A
0,57	4-MU	PRICE	1972	Isoenzym I ₂
0,65	4-MU	STIRLING	1972	Isoenzym A
0,55	4-MU	STIRLING	1972	Isoenzym P

Das von uns bestimmte Isoenzym A aus Lebergewebe ergab einen K_m - Wert von 0,95 mM.

Wird die K_m der β -Glucosaminidase bestimmt, deren Herkunft aus anderen menschlichen Geweben und Gewebsflüssigkeiten als dem Serum stammt, so finden sich auch bei diesen Vergleichen K_m - Werte, die in der Nähe des in dieser Arbeit ermittelten Wertes für das Isoenzym A aus Lebergewebe liegen.

Die Zusammenstellung gibt eine kurze Übersicht über einige von anderen Autoren gemessene Michaelis-Konstanten des Enzyms aus verschiedenen menschlichen Geweben.

K_m (mM)	Substrat	Gewebe	Autor	Jahr	Besonderheiten
0,82	p-NP	Synovia/Leuko- cyten	CAYGILL	1965	--
0,67	4-MU	Milz	ROBINSON	1968	Isoenzym A, B
0,90	4-MU	Niere	DANCE	1969	--
0,83	p-NP 4-MU	Hautfibro- blasten	KANFER	1973	Isoenzym A, B Gesamt- β -NAG
1,1	4-MU	Plazenta	TALLMAN	1974	Isoenzym A
0,63	p-NP	Amnionzellen	HULTBERG	1976	--
0,88	4-MU	Leukocyten	KOLODNY	1976	--
0,64	4-MU	Lymphocyten	CROCKARD	1979	--
0,59	4-MU	B-Lymphocyten	CROCKARD	1979	--
0,60	4-MU	T-Lymphocyten	CROCKARD	1979	--

Interessant ist an dieser Tabelle, daß die Isoenzyme A und B, isoliert aus Hautfibroblasten, Milz und Plazenta jeweils identische K_m - Werte zeigen, während die Werte in den einzelnen Untersuchungen doch etwas variieren. Bei der Beurteilung der verschiedenen Werte ist zu berücksichtigen, daß mit dem Substrat p-Nitrophenyl- β -D-N-acetylglucosaminid bei sehr hohen Substratkonzentrationen ($> 0,015$) eine kompetitive Hemmung des Enzyms eintritt. Daher lassen sich für die Michaelis-Konstante keine Werte oberhalb dieser Molarität erhalten. Außerdem ist zu beachten, daß die Ermittlung der Michaelis-Konstanten grafisch erfolgt, wobei die Genauigkeit des Kurvenverlaufs zumeist nur ungefähr ermittelt werden kann.

4. 3. 7. I S O E L E K T R I S C H E P U N K T E

Die für die Elektrofokussierung wichtigen isoelektrischen Punkte der Gesamt- β -Glucosaminidase und der Isoenzyme lauten wie folgt :

Gesamt-Enzym pH 4,73

Isoenzym A pH 5,0

Isoenzym B pH 7,3

Isoenzym P pH 5,5 - 7,0 (SANDHOFF 1968; HAYASE 1973;
POTT 1978).

4. 4. S C H O C K P A T I E N T E N

Bei 55 % der Schockpatienten ergaben sich erhöhte Serumaktivitäten der β -Glucosaminidase im Vergleich zum Gesunden.

Die Tatsache, daß beim haemorrhagischen oder endotoxischen Schock die Aktivität saurer Hydrolasen im zirkulierenden Plasma ansteigt, ist seit längerer Zeit bekannt (JANOFF 1962; DUMONT 1964; REICH 1965; SUTHERLAND 1968; BARANKAY 1969; CLERMONT 1972; FREDLUND 1972; SPATH 1974; ARFMAN 1975). Dieser Anstieg könnte ein kausal bedingender Faktor in der Pathogenese des Schocks sein (JANOFF 1964; SUTHERLAND 1968; GAZZANIGA 1970; GLENN 1972). Andere Autoren jedoch bezweifeln diese Erklärungsmöglichkeit (ALHO 1970; CLERMONT 1972).

Die Zellen, die im Schockstadium das Enzym freisetzen, sind bisher noch nicht endgültig identifiziert. Einige Untersuchungen weisen auf die Leber hin (SHORR 1951; BITENSKI 1963; SELKURT

1964; ALHO 1970; NUNES 1970).

Histologische Veränderungen in den Intestinalzellen beim Schock legen die Vermutung nahe, daß hier die Hauptquelle der ansteigenden Enzymaktivität im Plasma liegt (SUTHERLAND 1968; CLERMONT 1972).

Da die sauren Hydrolasen einschließlich der β -Glucosaminidase ein Molekulargewicht $> 100\,000$ haben, kann vermutet werden, daß nach Freisetzung aus der Zelle ihr Transport zum Blut mit Hilfe des Lymphstromes geschieht.

Den hier aufgeworfenen Fragen ging COURTICE (1974) in einer Untersuchung an Kaninchen nach, die einem haemorrhagischen Schock ausgesetzt wurden. Seine durch biochemische und histochemische Untersuchungen der Leber, der hepatischen Lymphe, des Lymphstroms im Ductus thoracicus und des Intestinums gewonnenen Ergebnisse unterstreichen die führende Rolle der Leber im haemorrhagischen Schock. Das intestinale Gewebe zeigte im Gegensatz zu früheren Beobachtungen (SUTHERLAND 1968; CLERMONT 1972) nur geringe Veränderungen der Lysosomen. Dagegen wiesen die Lysosomen in den histologischen Leberpräparaten deutliche Veränderungen in der Größe auf. Es scheint festzustehen, daß im Schock eine vermehrte Permeabilität der Leberlysosomenmembran auftritt. Solch eine Veränderung könnte in Beziehung gesetzt werden zu der reduzierten Osmolalität des intrazellulären Mediums, bedingt durch die zelluläre Hypoxämie im Schock. Zu der Frage, wie die aus den Lysosomen austretenden Enzyme in den Blutstrom gelangen, weisen die Ergebnisse von COURTICE (1974) darauf hin, daß der Lymphweg keine bedeutende Rolle spielt, da hier die Aktivitäten der

β -Glucosaminidase nicht parallel mit den Serumaktivitäten ansteigen, sondern nahezu konstant bleiben. Es ist also anzunehmen, daß im Schock das Enzym, dessen erhöhte Serumaktivität gemessen wird, hauptsächlich aus der Leber kommt und auf direktem Wege nach Austritt aus den veränderten Lysosomen in den Blutstrom gelangt.

4. 5. HERZINFARKTPATIENTEN

Bei der Untersuchung von 30 Herzinfarktpatienten fand sich in 40 % der Fälle ein Aktivitätsanstieg der β -Glucosaminidase im Serum.

In einer Arbeit von WELMAN (1978) wird auf die Rolle des Enzyms im akuten Stadium des Infarktes hingewiesen. Dabei zeigte sich, daß der Gipfel des Aktivitätsanstiegs 18 Stunden nach Auftreten der ersten Brustschmerzen gefunden wurde. Dann fiel die Serum- β -Glucosaminidase-Aktivität schnell wieder auf normale Werte ab, um einen erneuten, kleineren Aktivitätsgipfel 72 Stunden nach Auftreten der akuten Beschwerden zu zeigen. Bei der Auswertung der gemessenen Aktivitäten der β -Glucosaminidase gegen die während derselben Untersuchung registrierte Aktivität der Creatinkinase, ergab sich zwischen beiden Enzymen eine lineare Abhängigkeit. Dieses korrelierte Verhalten konnte in unserer Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Ein Grund für diesen Unterschied kann darin vermutet werden, daß der Zeitpunkt der Blutentnahme bei den hier besprochenen 30 Herzinfarktpatienten nicht exakt

derselbe war, sondern sich in einem Schwankungsbereich von bis zu 3 Stunden bewegte und der Aktivitätsgipfel bei 18 Stunden nicht in die untersuchten Werte einging.

Es wird vermutet, daß die Serumaktivität des Enzyms im akuten Myokardinfarkt direkt aus dem Herzen stammt. Dies wäre möglich, indem bei der einsetzenden Nekrose der Herzmuskelzellen diese ihren Bestand an lysosomalen Hydrolasen verlieren, und ein Teil im Blut wieder erscheint. Eine solche Erklärung wäre für den initialen Anstieg der Serum- β -Glucosaminidase-Aktivität verständlich. In der Folge könnte es dann zu einem erneuten Aktivitätsanstieg kommen durch Freisetzung des Enzyms aus Leukocyten und Makrophagen, deren vermehrtes Auftreten beim Myokardinfarkt bekannt ist (WELMAN 1978).

Leider wird in der besprochenen Arbeit nicht auf den Einfluß der Leber eingegangen. Einerseits ist daran zu denken, daß ein Großteil der Enzymaktivität in den Leberlysosomen gebunden ist.

" Andererseits ist für einen großen Herzinfarkt das akute Absinken des Blutdrucks charakteristisch, was man sich mit dem Eintritt eines Schonreflexes, und zwar des Bezold-Jarisch-Reflexes erklärt, der gewissermaßen die Gesamtspannung des Kreislaufs herabsetzt und damit die Gefahr des akuten Herzwandaneurysmas vermindern soll. Reicht die übriggebliebene Kraft des Herzens aus, so kommt es wieder zum Anstieg des Blutdrucks " (REINSTEIN 1960). Die im Gefolge des Blutdruckabfalls auftretende zelluläre Hypoxie könnte, wie bereits beim Schock diskutiert, auch beim Myokardinfarkt zu Veränderungen der Permeabilität in den Leberlysosomenmembranen mit Freisetzung des Enzyms führen. Aus diesem Grunde soll im folgenden Abschnitt auf die Stellung der Leber im

Stoffwechsel der β -Glucosaminidase eingegangen werden und einige Ergebnisse, die bei Lebererkrankungen gewonnen wurden, erwähnt werden.

4. 6. β - G L U C O S A M I N I D A S E - A K T I V I - T Ä T U N D L E B E R E R K R A N K U N G E N

Die äußerst wichtige Rolle der Leber im Stoffwechsel der β -Glucosaminidase wird dadurch ausgedrückt, daß dieses Organ nach der Nebenniere die höchsten Gesamtaktivitäten des Enzyms aufweist (HARZER, SANDHOFF 1971). Einige andere Gewebe sind ebenfalls reich an β -Glucosaminidase wie Plazenta, Niere und Milz, aus der 1968 zum ersten Mal die beiden Isoenzyme A und B isoliert wurden (ROBINSON 1968). Das Blutserum enthält im Gegensatz zu diesen Geweben beim Gesunden nur einen sehr geringen Enzymbestand (HARZER 1971).

Viele Untersuchungen haben sich mit der Enzymaktivität und dem Isoenzymmuster in der Leber bei Kranken und Gesunden befaßt. WOOLLEN (1965) fand bei 8 Fällen von infektiöser Hepatitis bei allen seinen Patienten erhöhte Plasmaaktivitäten des Enzyms. NAKAMURA untersuchte 1970 die chronische Form der Hepatitis und fand auch in diesen Fällen, wie bei der ebenfalls untersuchten Lebercirrhose, erhöhte Serumaktivitäten der β -Glucosaminidase. Die höchsten Serumaktivitäten zeigten einige Patienten mit Hepatomen.

Untersuchungen an Kindern mit Hepatitis epidemica erbrachten auch bei diesen Fällen erhöhte Serumaktivitäten (STEJSKAL et al. 1971).

Bei 200 untersuchten Patientenserum mit akuter Hepatitis, chronischer Hepatitis und Lebercirrhose ergaben sich bei der akuten Form hochsignifikante Aktivitätssteigerungen ($p < 0,0005$). Beim Vergleich der Aktivitäten des chronischen Stadiums mit denen des akuten Stadiums fand sich ein leicht signifikanter ($p < 0,05$) Aktivitätsabfall, während bei der Lebercirrhose die Aktivitäten wieder hochsignifikant ($p < 0,0005$) anstiegen. Die Ergebnisse der AST, ALT, LDH und alkalischen Phosphatase sowie die der Konzentrationsbestimmung von Cholesterin und Bilirubin im Serum wurden mit den gemessenen β -Glucosaminidase-Aktivitäten korreliert. Dabei fand sich in keinem Fall eine signifikante Korrelation (PLATT 1969).

In einer Untersuchung mit Ratten, die einer Tetrachlorkohlenstoffinhalation ausgesetzt waren, zeigte sich im Stadium der akuten Lebererkrankung im Serum wiederum ein Anstieg der β -Glucosaminidase-Aktivität, während simultan in der lysosomalen Fraktion, die direkt aus dem Lebergewebe gewonnen wurde, die Enzymaktivität herabsank. Im chronischen Stadium der Erkrankung wiesen dann beide, Serum und Leberfraktion, erhöhte Enzymaktivität auf. Dieser Effekt war umso stärker, je weiter fortgeschritten der Befund war (KOIZUMI 1968).

Da der Schweregrad und damit der Verlauf chronischer Lebererkrankungen maßgeblich vom Ausmaß der Mesenchymreaktion in der Leber bestimmt ist, wurde untersucht inwieweit erhöhte Serumaktivitäten der β -Glucosaminidase zum Grad der Mesenchymreaktion in Beziehung gesetzt werden konnten. Bei der Untersuchung von histologisch gesicherten Fällen von persistierender Hepatitis, toxisch nutritivem Leberschaden, chronischer aggressiver Hepatitis und

Lebercirrhose fand sich ein deutlicher Aktivitätsanstieg des Serumenzym mit zunehmendem Grad der Mesenchymreaktion. Signifikante Korrelationen zwischen β -Glucosaminidase und Serum-ALT, γ -GT und Cholinesterase ließen sich auch hier nicht feststellen (POTT 1978).

Bei Verwendung einer neuen Technik zur Kenntlichmachung der Isoenzymmuster, der Elektrofokussierung auf Polyacrylamid-gel-Platten, fiel dann auf, daß das bei Gesunden mit dieser Methode nicht nachweisbare Isoenzym P bei Patienten mit akuten und chronischen Lebererkrankungen auftrat. Eine Erhöhung des Isoenzym P zeigte sich dann, wenn die Serum-ALT erhöht war (POTT 1978). Dieser Befund ließ vermuten, daß das Isoenzym P unter ähnlichen Bedingungen wie die Serum-ALT bei Schädigungen der Leberzelle in das Serum gelangt. Damit war zugleich ein Indiz dafür gefunden, daß das Isoenzym P, das im Serum auftrat, nicht lysosomaler Herkunft war, sondern wahrscheinlich aus dem Zytoplasma (wie ALT) stammte.

4. 7. β - G L U C O S A M I N I D A S E U N D V E R - S C H I E D E N E E R K R A N K U N G E N

Bei einigen anderen Erkrankungen, die hier noch kurz angeführt werden sollen, finden sich zum Teil deutliche Aktivitätsanstiege der β -Glucosaminidase. Außerdem werden in diesem Zusammenhang solche Erkrankungen erwähnt, bei denen sich keine Aktivitätsänderungen des Enzyms im Vergleich zum Gesunden zeigten.

4. 7. 1. G E L E N K E R K R A N K U N G E N

In Studien an Patienten mit rheumatischer Polyarthrits, Osteo-

untersuchten Fälle mit Diabetes mellitus gegenüber Kontrollpersonen erhöht. Eine Korrelation zur Blutglucosekonzentration findet sich bei Blutglucosewerten von über 200 mg/dl ($p < 0,001$) (BELFIORI 1974).

Ähnlich signifikante Anstiege des Enzyms finden sich im Serum. Dabei ist die Aktivitätserhöhung umso ausgeprägter, je höher der Blutglucosewert steigt und je häufiger sich deutliche Zeichen der begleitenden Mikro- und Makroangiopathie zeigen (BELFIORI 1972).

Untersucht man das Isoenzymmuster der β -Glucosaminidase bei Patienten mit juvenilem Diabetes mellitus, so steigen die Aktivitäten der Isoenzyme A und B an. Das Isoenzym I (P) zeigt dieses Verhalten nicht (NAKAGAWA 1977).

4. 7. 5. N I E R E N E R K R A N K U N G E N

Erhöhte Aktivitäten des Enzyms im Urin findet man bei Patienten mit Nierenerkrankungen. Der Aktivitätsanstieg hängt hier vom Stadium der Erkrankung ab. Im aktiven Stadium der Erkrankung ist der Enzymanstieg sehr hoch, während bei chronischen Nierenerkrankungen im inaktiven Stadium geringere Ausscheidungen des Enzyms im Urin festgestellt werden (DANCE 1970). Das Isoenzymmuster der β -Glucosaminidase zeigt bei diesen Erkrankungen die Anwesenheit des Isoenzym B, das im normalen Urin nicht angetroffen wird (DANCE 1970).

Weitere Erkrankungen mit zum Teil erhöhter Enzymaktivität sind einige Fälle von neoplastischen Neubildungen (WOOLLEN 1965; TETTAMANTI 1977).

4. 8. S C H W A N G E R S C H A F T

Untersuchungen an Schwangerenseren weisen auf ansteigende Serumaktivitäten des Enzyms mit der Dauer der Schwangerschaft hin. Dieses Ergebnis gab zu der Vermutung Anlaß, daß die β -Glucosaminidase einer hormonalen Kontrolle unterstehen könne (WOOLLEN 1965; DOFFOEL 1975). Weitere Untersuchungen in dieser Richtung sind sicherlich wünschenswert.

4. 9. Z U S A M M E N F A S S U N G U N D A B S C H L I E - B E N D E B E M E R K U N G

In der vorliegenden Arbeit wurde die N-Acetyl- β -Glucosaminidase E.C. 3.2.1.30, ein Enzym, das beim Abbau von Mucopolysaccharid-Proteinkomplexen beteiligt ist, untersucht. Die Vorstellung eines verbesserten Testsystems mit Hilfe eines p-Nitrophenol-Derivates wurde durch Bestimmung des Enzyms in 85 Seren gesunder Personen, des pH-Optimums mit $\text{pH} = 4,2$ und der Michaelis-Konstanten $K_m = 0,98 \text{ mM}$ ermöglicht.

Die zugleich durchgeführte Untersuchung eines gereinigten Isoenzym A der β -Glucosaminidase aus Lebergewebe ergab ein pH-Optimum von $\text{pH} = 4,2$ und eine Michaelis-Konstante K_m von $0,95 \text{ mM}$.

Das pH-Optimum des Serums einer histologisch gesicherten Lebercirrhose zeigte ein pH von $4,2$ und eine K_m von $0,90 \text{ mM}$.

Bei der Einteilung der Normalseren in drei Altersgruppen ergab sich ein signifikanter Anstieg des Enzyms mit zunehmendem Alter. Ein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Seren konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der Seren von Herzinfarkt- und Schockpatienten wurde jeweils ein signifikanter Anstieg des Enzyms gefunden.

Aus der Aufstellung einer Vielzahl von Erkrankungen, die zu einem Anstieg der Serumenzymaktivität führen und damit einen mehr oder weniger großen Einfluß auf die Freisetzung des Enzyms haben müssen, läßt sich erkennen, daß eine gemessene β -Glucosaminidase-Aktivitätserhöhung nicht als krankheitsspezifisch beurteilbar ist.

Da fast jedes Gewebe des menschlichen Körpers Lysosomen enthält, kann man auch nicht von einer Organspezifität sprechen. Trotzdem erscheint es aus den hier dargelegten Gründen wichtig, bei der Untersuchung der β -Glucosaminidase im Serum die Rolle der Leber und des Mesenchymstoffwechsels genauer zu analysieren. Die hier vorgestellte Testverbesserung soll eine Möglichkeit zur einfachen und sicheren Bestimmung der Serumaktivität des Enzyms bieten.

5. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Alho, A.:

Lysosomal enzymes in murine tourniquet shock.
Acta Chir Scand 136, 555-560 (1970)

Arfman, R.C.; Loegering, D.J.; Smith, J.J.:

Changes in plasma levels of lysosomal and non
lysosomal enzymes during hemorrhagic hypotension
Proc Soc Exp Biol Med 149, 1029-1031 (1975)

Avila, J.L.; Convit, J.:

Studies on human polymorphonuclear leukocyte
enzymes. I. Assay of acid hydrolases and other enzymes.
Biochim biophys A 293, 397-408 (1973)

Bahl, O.P.; Agrawal, K.M.L.:

Glycosidases of Phaseolus vulgaris.
J Biol Chem 243, 98-102 (1968)

Bahl, O.P.; Agrawal, K.M.L.:

Glycosidases of Aspergillus niger.
J Biol Chem 244, 2970-2978 (1969)

Barankay, T.; Horpacsy, G.; Nagy, S.; Petri, G.:

Changes in the level of lysosomal enzymes in
plasma and lymph in hemorrhagic shock.
Med Exp 19, 267-271 (1969)

Belfiori, F.; Napoli, E.; Lo Vecchio, L.:

Serum N-acetyl-beta-glucosaminidase activity
in diabetic patients.
Diabet 21/12, 1168-1172 (1972)

Belfiori, F.; Lo Vecchio, L.; Napoli, E.; Borzi, V.:

Increased B-N-acetyl-glucosaminidase activity
in diabetes mellitus.
Clin Chem 20/9, 1220-1230 (1974)

- Bentley, E.; Yoshida, A.; Kuhl, W.; Lee, J.D.:
The subunits of human hexosaminidase A.
Biochem J 152, 541-543 (1970)
- Bitensky, L.; Chayon, J.; Cunningham, G.J.; Fine, J.:
Behaviour of lysosomes in haemorrhagic shock.
Nature 192, 493-494 (1963)
- Borooah, J.K.; Leaback, D.H. & Walker, P.G.:
Substrate for N-acetyl- β -glucosaminidase.
Biochem J 78, 105 (1961)
- Braidman, I.; Carroll, M.; Dance, N.; Robinson, D.:
Separation and properties of human brain hexo-
saminidase C.
Biochem J 143, 295-301 (1974)
- O'Brien, J.S.:
Five gangliosidoses.
Lanc 2:805 (1969)
- O'Brien, J.S.; Okada, S.; Chen, A.; Fillerup, D.L.:
Detection of heterozygotes and homozygotes by
serum hexosaminidase assay.
Ne Engl J Med 283, 15-20 (1970)
- Carroll, M.; Robinson, D.:
Immunological properties of N-acetyl- β -glucosami-
nidase of normal human liver and of GM₂-gangliosio-
dosis liver.
Biochem J 131, 91-96 (1973)
- Caygilli, J.C.; Jevons, F.R.:
Presence of glucosaminidase activity in human synovial
fluid and its inhibition by gold compounds.
Clin chim Acta 11, 233 (1965)

Caygill, J.C.; Roston, C.P.J.; Jevons, F.R.:

Purification of β -N-acetylglucosaminidase and
 β -galactosidase from ram-testis.

Biochem J 98, 405-409 (1966)

Caygill, J.C.; Jevons, F.R.:

β -Glucosaminidase activity in human synovial
fluid, blood plasma and leucocytes.

Clin chim Acta 13, 61-66 (1966)

Clermont, H.G.; Adams, J.T.; Williams, J.S.:

The effect of cross circulation in hemorrhagic
shock.

Surg Gyn Obstet 135, 503-509 (1972)

Cotlier, E.:

Tay-Sachs disease: Abbreviated serum hexosaminidase
test from finger-tip samples.

Clin chim Acta 38, 233-234 (1972)

Courtice, F.C.; Adams, E.P.; Shannon, A.D.:

Acid hydrolases in the rabbit in haemorrhagic shock.

Q J Exp Phys 59, 31-42 (1974)

Crockard, A.D.; Lewis, M.H.R.; Bridges, J.M.:

N-Acetyl- β -D-glucosaminidase activity in normal and
chronic lymphocytic leukaemic lymphocytes.

Clin chim Acta 93, 151-156 (1979)

Dance, N.; Price, R.G.; Robinson, D.; Stirling, J.L.:

β -Galactosidase, β -glucosidase and N-acetyl- β -
 β -glucosaminidase in human kidney.

Clin chim Acta 24, 189-197 (1969)

Dance, N.; Price, R.G.:

The excretion of N-acetyl- β -glucosaminidase and
 β -galactosidase by patients with renal disease.

Clin chim Acta 27, 87-92 (1970)

- Delvin, E.; Pottier, A.; Sriver, C.R.; Gold, R.J.:
The application of an automated hexosaminidase
assay to genetic screening.
Clin chim Acta 53, 135-142 (1974)
- Delfool, S.; Egty, J.M.; Jurf, J.G.:
Demonstration of isoenzymes of human serum
N-acetyl-beta-D-hexosaminidases during pregnancy.
Ann Biol Clin 32, 435-441 (1975)
- Dumont, A.E.; Weissmann, G.:
Lymphatic transport of beta-glucuronidase
during haemorrhagic shock.
Nature 201, 1231-1232 (1964)
- Ellis, B.G.; Tucker, S.M.; Thompson, A.E.; Price, R.G.:
Presence of serum and tissue forms of N-acetyl-
beta-glucosaminidase in urine from patients with renal
diseases.
Clin chim Acta 64, 195-202 (1975)
- Fallet, G.H.; Micheli, A.; Boussina, I.:
Activity of 4 lysosomal enzymes in rheumatoid
polyarthritis and in arthrosis.
Rev méd Suisse rom 90, 507-520 (1970)
- Findlay, J.; Levvy, G.A.:
Purification of beta-N-acetylglucosaminidase from
the pig epididymis.
Biochem J 77, 170-175 (1960)
- Fredlund, P.E.; Öckerman, N.E.; Vang, J.O.:
Plasma activities of acid hydrolases in
experimental oligemic shock in the pig.
Am j surg 124, 300-306 (1972)
- Gazzaniga, A.B.; O'Connor, N.E.:
Effects of intravenous infusion of autologous
kidney lysosomal enzymes in the dog.
Ann Surg 172, 804-812 (1970)

Glenn, T.M.; Lefer, A.M.; Beardsley, A.C.:

Circulatory responses to splanchnic lysosomal
hydrolases in the dog.

Ann Surg 176, 120-127 (1972)

Goldstone, A.; Konecny, P.; Koenig, H.:

Lysosomal hydrolases: Conversion of acidic to basic
forms by neuraminidase.

FEBS Letters 13, 68-72 (1971)

Harzer, K.; Sandhoff, K.:

Age-dependent variations of the human N-acetyl- β -D-
hexosaminidases.

J Neurochem 18, 2041-2050 (1971)

Harzer, K.:

Erste Erfahrungen bei der pränatalen Diagnose der
Tay-Sachsschen Erkrankung durch isoelektrische
Fokussierung der Hexosaminidase A aus Amnionflüssigkeit.
Klin Wschr 52, 145-147 (1974)

Hasebe, K.:

Biochemical studies on synovial fluid.

Fukush J med Sci 15, 35-44 (1968)

Hayase, K.; Kritchevsky, D.:

Separation and comparison of isoenzymes of N-acetyl-
 β -D-hexosaminidase of pregnancy serum by polyacrylamide
gel electrofocusing.

Clin chim Acta 46, 455-464 (1973)

Hickman, S.; Neufeld, E.F.:

A hypothesis for I cell disease: Defective hydrolases that
do not enter lysosomes.

Biochem biophys Res Comm 42, 112-114 (1972)

Holmberg, G.J.M.; Velthuis, W.A.; Oudega, P.:

Electrophoretic separation of β -N-acetylglucosaminidase of
human and bovine brain and liver and of Tay-Sachs brain tissue.

Br J Gen Zs 153, 11-14 (1972)

Hultberg, B.:

N-Acetylhexosaminidase activities in Tay-Sachs disease.
Lanc 2:1105 (1969)

Hultberg, B.; Lindstein, J.; Sjöblad, S.:

Forms of glycosidases in cultures of amniotic-fluid cells.
Biochem J 155, 599-605 (1976)

Ikonne, J.M.; Rattazzi, M.C.; Desnick, R.J.:

Am J hum Genet 27, 639-650 (1975)

Janoff, A.; Weissmann, G.:

Pathogenesis of experimental shock.
J Exp Med 116, 451-466 (1962)

Janoff, A.; Zweifach, B.W.:

Production of inflammatory changes in microcirculation
by cationic proteins extracted from lysosomes.
J Exp Med 120, 747-764 (1964)

Kaback, M.M.; Ziegler, R.S.:

Heterozygote detection in Tay-Sachs disease: a prototype
community screening program for the prevention of recessive
genetic disorders.
Adv Exp Med Biol 12, 613-632 (1972)

Kafer, J.N.; Spielvogel, C.:

Hexosaminidase activity of cultured human skin fibroblasts.
Biochim biophys A 293, 203-207 (1973)

Kar, N.C.; Pearson, C.M.:

Serum D-acetylglucosaminidase and arylsulfatase A in
inflammatory disorders of muscle and connective tissue.
Proc Soc Exp Biol Med 140, 1480-1485 (1972)

Kar, N.C.; Pearson, C.M.:

Elevated levels of serum-acetylglucosaminidase in
some patients with rheumatoid arthritis.
Proc Soc Exp Biol Med 142, 398-400 (1973)

Koizumi, T.; Suematsu, T.; Iwabori, N.; Abe, H.:

Changes in N-Acetyl- β -glucosaminidase activity in hepatic damage.

Biochim biophys Acta 151, 628-636 (1968)

Kolodny, E.H.; Mumford, R.A.:

Human leukocyte acid hydrolases: Characterization of eleven lysosomal enzymes and study of reaction conditions for their automated analysis.

Clin chim Acta 70, 247-257 (1976)

Leaback, D.H.; Walker, F.G.:

Studies on glucosaminidase.

Biochem J 78, 151-156 (1961)

Lineweaver, H.; Burk, D.:

The determination of enzyme dissociation constants.

J Am Chem Soc 56, 658-667 (1934)

Lowden, J.A.; La Ramee, M.A.; Lang, E.; Zucker, S.:

Tay-Sachs heterozygote detection in mass-carrier screening in Toronto.

Clin Res 20, 930 (1972)

Lowden, J.A.; Skomorowski, M.A.; Henderson, F.; Kaback, M.:

Automated assay of hexosaminidase in serum.

Clin Chem 19, 1345-1349 (1973)

Mersmann, G.; von Figura, K.; Buddecke, E.:

Physical properties and biological activities of two forms of α -N-acetylglucosaminidase from bovine spleen.

Biochim biophys A 364, 88-96 (1974)

Molzer, B.; Bernheimer, H.:

Detection of GM₂-gangliosidosis (Tay-Sachs and Sandhoff disease) gene carriers by serum hexosaminidase assay.

Clin chim Acta 73, 163-166 (1976)

Muramatsu, T.:

B-N-acetylhexosaminidase From a gastropod *Turbo cornutus*.
J Biochem 64, 521-531 (1968)

Nakagawa, S.; Kumin, S.; Nitowsky, H.M.:

Human hexosaminidase isoenzymes; chromatographic separation as an aid to heterozygote identification.
Clin chim Acta 75, 181-191 (1977)

Nakamura, N.; Iwabori, N; Koizumi, T.:

Serum hyaluronidase activity in chronic liver damage.
Clin chim Acta 27, 47-52 (1970)

Nunes, G.; Blaisdell, F.W.; Margaretten, W.:

Mechanism of hepatic dysfunction following shock and trauma.
Arch Surg 100, 546-556 (1970)

Okada, S.; O'Brien, J.S.:

Tay-Sachs disease: generalized absence of a beta-D-N-acetyl-hexosaminidase component.
Sci 165, 698-700 (1969)

Platt, D.; Leineweber, B.:

Aktivitätsmessung lysosomaler und cytoplasmatischer Enzyme im menschlichen Serum bei Leberkrankheiten.
Verh dt Ges inn Med 75, 352-354 (1969)

Platt, D.:

Altersabhängige Aktivitätsänderungen lysosomaler Enzyme (Glycosaminoglycano-Hydrolasen) in Serum und Organen des Menschen.
Dt med Ws 12, 634-637 (1970)

Platt, D.; Eimer, H.:

Aktivitätsmessungen lysosomaler Enzyme im menschlichen Serum nach Gabe von hormonalen Kontraceptiva.
Klin Ws 51, 91-92 (1973)

Pott, G.; Eberhardt, G.; Gerlach, U.:

Zur Beurteilung der Mesenchymreaktion bei Patienten mit
chronischen Leberkrankheiten.

Z.Gastroenterologie 16, 32-37 (1978)

Pott, G.; Chi-Boesler, D.; Gerlach, U.:

Isoenzymes of N-Acetyl- β -glucosaminidase from human
liver and serum. Separation by electrofocusing in
thin layers of polyacrylamide gel.

J Clin Chem Clin Biochem 16, 15-18 (1978)

Pott, G.; Eberhard, G.; Gerlach, U.:

Isoenzym P der N-Acetyl- β -glucosaminidase im Serum
bei Leberkranken.

Klin Ws 56, 681-682 (1978)

Pott, G.:

Habilitationsschrift (1979)

Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Price, R.G.; Dance, N.; Richards, B.; Cattell, W.R.:

The excretion of N-acetyl- β -glucosaminidase and
 β -galactosidase following surgery to the kidney.

Clin chim Acta 27, 65-72 (1970)

Price, R.G.; Dance, N.:

The demonstration of multiple heat stable forms of
N-acetyl- β -glucosaminidase in normal human serum.

Biochim biophys A 271, 145-153 (1972)

Fugh, D.; Leaback, D.H.; Walker, P.G.:

Studies on glucosaminidase.

Biochem J 65, 464-469 (1957)

Reich, T.; Dierolf, B.M.; Reynolds, B.M.:

Plasma cathopsin-like acid proteinase activity during
haemorrhagic shock.

J surg Res 2, 116-119 (1965)

Reinstein, H.:

Kardiologie für die tägliche Praxis.
Hippokrates Verlag, Stuttgart 1966

Robinson, D.; Stirling, J.L.:

N-acetyl- β -glucosaminidase in human spleen.
Biochem J 107, 321-327 (1966)

Rosenberg, D.; Cutler, R.:

Tay-Sachs carrier detection by mechanized serum
hexosaminidase assay.
Clin chim Acta 53, 247-253 (1974)

Sandhoff, K.:

Auftrennung der Säuger N-Acetyl- β -D-hexosaminidase
in multiple Formen durch Elektrofokussierung.
Ho Sey Zs 34, 1095-1098 (1968)

Sandhoff, K.; Conzelmann, E.; Nehr Korn, H.:

Specificity of human liver hexosaminidases A and against
glycosphingolipids G_{m2} and G_{a2}.
Ho Sey Zs 358, 779-787 (1977)

Selkurt, E.E.:

Role of liver and toxic factors in shock.
In Shock ed. Hersey, S.G.; p.43, Little Brown,
Boston (1964)

Shorr, E.; Zweifelach, B.W.; Furchgott, R.F.; Baez, S.:

Hepatorenal factors in circulatory homeostasis.
IV. Tissue origins of the vasotropic principles,
VEM and VDM, which appear during evolution of
hemorrhagic and tourniquet shock.
Circ 3, 42-79 (1951)

Spath, J.A.; Lane, D.L.; Lefer, A.M.:

Protective action of methylprednisolone on the myocardium
during experimental myocardial ischemia in the cat.
Circ Res 35, 44-51 (1974)

Srivastava, S.K.; Beutler, E.:

Antibody against purified human hexosaminidase B
cross-reacting with human hexosaminidase A.

Biochem biophys res Comm 47, 753-759 (1972)

Srivastava, S.K.; Wiktorowicz, J.; Klebe, R.; Awasthi, Y.C.:

Studies on β -D-N-acetylhexosaminidase.

Biochim biophys A 397, 428-436 (1975)

Stähler, F.:

Beurteilung und Kontrolle von Meßergebnissen.

In: Grundlagen der enzymatischen Analyse.

Bergmeyer, H.U. (Ed.)

Verlag Chemie, Weinheim 1977

Stejskal, J.; Teyshl, O.; Kania, V.; Snopková, J.:

GOT-, GPT-, m-GOT-, LDH₅-, N-Acetyl-beta-glucosaminidase-
Aktivität im Blutserum bei Kindern mit Hepatitis epidemica.
(Beitrag zur klinisch-biochemischen Klassifizierung.)

Ms Kinderheilk 112, 574-576 (1971)

Stirling, J.L.:

A new form of N-acetyl- β -glucosaminidase present
in pregnancy serum.

Biochem J 123, 11 (1971)

Stirling, J.L.:

Separation and characterisation of N-acetyl- β -glucosaminidases A and P from maternal serum.

Biochim biophys A 271, 154-162 (1972)

Sutherland, N.G.; Bounous, G.; Gurd, F.N.:

Role of intestinal mucosal lysosomal enzymes
in the pathogenesis of shock.

J Trauma 8, 350-377 (1968)

Suzuki, Y.; Suzuki, K.:

Partial deficiency of hexosaminidase component A in
juvenile GM₂-gangliosidosis.

Neurology 20, 848-851 (1970)

Swallow, D.M.; Evans, L.; Saba, N.; Harris, H.:

Characterization and tissue distribution of N-acetyl-hexosaminidase C: suggestive evidence for a separate hexosaminidase locus.

Ann Hum Genet 40, 55-66 (1976)

Tallman, J.F.; Brady, R.O.; Quirk, J.M.; Villalba, M.; Gal, A.E.:

Isolation and relationship of human hexosaminidases.

J B C 249/11, 3489-3499 (1974)

Tettamanti, G.; Lombardo, A.; Caimi, L.; Foà, V.:

Enzymes of lysosomal origin in serum: assay and significance. (1977)

Verpoorte, J.A.:

Isolation and characterization of the major beta-N-acetyl-D-glucosaminidase from human plasma.

Biochem 13, 713-722 (1974)

Wadström, T.; Hisatsune, K.:

Bacteriolytic enzymes from Staphylococcus aureus.

Biochem J 120, 725-754 (1976)

Wallis, W.A.; Roberts, H.V.:

Methoden der Statistik

Rowohlt 1960

Weber, E.:

Grundriß der biologischen Statistik.

Fischer, Stuttgart 1972

Welman, E.; Selwyn, A.P.; Peters, T.J.:

Plasma lysosomal enzyme activity in acute myocardial infarction.

Cardiovasc Res 12, 99-105 (1978)

Wermes, E.; Pott, G.; Buddecke, E.:

In: Fortschritte der Klinischen Chemie, Enzyme und Hormone. Kaiser, E. (Ed.)

Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, Wien 1972

Werries, E.; Freßmann, L.:

Eine verbesserte Methode zur quantitativen Trennung und präparativen Darstellung von β -N-Acetyl-glucosaminidasen A und B.

Ho Sey Zs 355, 1479-1482 (1974)

Woollen, J.W.; Heyworth, R.; Walker, P.G.:

Studies on glucosaminidase.

Biochem J 73, 111-116 (1961)

Woollen, J.W.; Walker, P.G.:

The fluorimetric estimation of N-Acetyl- β -glucosaminidase and β -galactosidase in blood plasma.

Clin chim Acta 12, 647-658 (1965)

Woollen, J.W.; Turner, P.:

Plasma N-Acetyl- β -glucosaminidase and β -glucuronidase in health and disease.

Clin chim Acta 12, 671-683 (1965)

6.

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. med. U.Gerlach danke ich für sein förderndes Interesse sowie für die Möglichkeit, in den von ihm geleiteten Institutsräumen die vorliegende Arbeit durchführen zu können.

Mein Dank gilt weiterhin insbesondere Herrn Prof. Dr. med. G.Pott für die Überlassung des Themas und für sein großes Interesse an meiner Arbeit sowie für die praktischen Ratschläge und Hilfen bei der Abfassung der Arbeit.

7.

L E B E N S L A U F

Am 28.01.1952 wurde ich, Detlev Gudemann, als drittes Kind des Arztes Hans-Karl Gudemann und seiner Ehefrau Ilse Gudemann, geb. Nolte, in Halle/Westf. geboren.

Nach Besuch der Volksschule in Halle/Westf. von 1958 bis 1962 wechselte ich auf das Kreisgymnasium in Halle/Westf. über, an welchem ich das Abitur im Jahre 1970 bestand.

Im gleichen Jahr wurde ich zum Grundwehrdienst nach Hamburg eingezogen.

Im Jahr 1972 nahm ich das Studium der Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster auf.

Im Jahr 1974 erhielt ich die Zulassung zum Medizinstudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, an welcher ich die Ärztliche Vorprüfung im Jahre 1976, den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Jahre 1977, den zweiten Abschnitt im Jahre 1979 und den dritten Abschnitt im Jahre 1980 erfolgreich ablegte.

